

SILVIA MARIA MILLAN GUTIERRE

**ECOFISIOLOGIA DE TELEÓSTEOS: O PAPEL DA TEMPERATURA NA
COMPREENSÃO DA DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES EM
DIFERENTES AMBIENTES**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Área de Concentração em Conservação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Viviane Prodócimo

Co-Orientadora: Dra Pamela J. Schofield

CURITIBA

2015

SILVIA MARIA MILLAN GUTIERRE

**ECOFISIOLOGIA DE TELEÓSTEOS: O PAPEL DA TEMPERATURA NA
COMPREENSÃO DA DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES EM
DIFERENTES AMBIENTES**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Área de Concentração em Conservação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Viviane Prodocimo

Co-Orientadora: Dra Pamela J. Schofield

**CURITIBA
2015**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



Ata da defesa de Tese da aluna Silvia Maria Millan Gutierrez

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, foi realizada no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa da tese da doutoranda Silvia Maria Millan Gutierrez: "ECOFISIOLOGIA DE PEIXES TELEÓSTEOS: O PAPEL DA TEMPERATURA NA COMPREENSÃO DA DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DAS ESPÉCIES DE PEIXES EM DIFERENTES AMBIENTES". A abertura teve início às 14h00min pelo Dra. Viviane Prodócimo, orientadora e presidente da banca. A senhora Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e em seguida passou a palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a aluna passou a ser arguido pelos membros da banca: Dra. Marta Marques de Souza, Dr. Carlos Augusto Navas Iannini, Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire e Dra. Marisa Fernandes de Castilho. Finda a defesa da tese, a senhora presidente da banca examinadora, fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a banca iria proceder ao ato de atribuição do resultado final, reunindo-se em sessão secreta. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após este intervalo, foram proclamados os resultados atribuídos pela banca examinadora, que decidiu pela "APROVAÇÃO da tese", tendo a candidata cumprido o artigo sessenta e cinco da Resolução 65/09 – CEPE, e o mesmo fez jus ao grau de Doutora em Ecologia e Conservação, área de concentração em Ecologia e Conservação. Como não havia nada mais a ser tratado, a Dra. Viviane Prodócimo, presidente da banca examinadora, após informar que a candidata tem, a partir desta data, sessenta dias para a entrega da versão definitiva de sua tese, deu por encerrada a sessão. Eu, Isabela Galarda Varassin, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os membros examinadores.

XX

Prof. Dra. Viviane Prodócimo
Orientadora e Presidente

Prof. Dra. Marta Marques de Souza
Membro

Prof. Dr. Carlos Augusto Navas Iannini
Membro

Prof. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Membro

Prof. Dra. Marisa Fernandes de Castilho
Membro

Prof. Dra. Isabela Galarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO



Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990, Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1555 – Fax (41) 3366-2042 – ecologia@ufpr.br
<http://www.ppgs.ufpr.br/8080/ecologia/>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Viviane Prodocimo pelo conhecimento passado e pela amizade durante toda essa jornada de pós-graduação;

Aos professores que de certa forma me co-orientaram durante o doutorado, em especial a professora Carolina A. Freire por sempre estar pronta a ajudar;

À Dra. Pamela Schofield por me receber tão bem e me orientar no meu doutorado sanduiche;

Ao Dr. Adalberto Val e todo pessoal do LEEM – INPA pela ajuda e ensinamentos;

Aos amigos do LFCO, minha família científica, sempre me apoiando e dando forças no laboratório e fora dele;

Aos meus amigos, que são meus alicerces;

À minha família, pela paciência e por ser a base do meu ser;

A todos que de certa forma me ajudaram nessa conquista.

*“Abre a mente ao que eu te revelo
e retém bem o que eu te digo,
pois não é ciência
ouvir sem reter o que se escuta.”*
(Dante Alighieri)

“The fish is the fish.”
(J. Schulte)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	viii
RESUMO GERAL	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	17
Objetivo Geral	17
Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO 1 - TEMPERATURA CRÍTICA E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70) EM PEIXES TELEÓSTEOS DE DIFERENTES AMBIENTES AQUÁTICOS	18
SUMÁRIO	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	24
Coleta	25
Experimentos de Limite Térmico	26
Expressão de HSP70 por Western Blotting	27
Análise estatística	28
RESULTADOS	28
Temperatura Crítica	28
HSP70	29
DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2 - TOLERÂNCIA TÉRMICA E EXPRESSÃO DE HSP70 DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	48
SUMÁRIO	49
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51

MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase	56
Expressão das proteínas por Western Blotting (HSP70)	56
Expressão do RNA-HSP70 através de Real-time PCR	58
Análise Estatística	59
RESULTADOS	59
Temperatura Crítica Máxima (CTMáx)	59
Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase.....	59
Expressão de HSP70 por Western Blotting	60
qPCR.....	62
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	69
 CAPÍTULO 3 – TOLERÂNCIA SALINA E TÉRMICA DO PEIXE AMAZÔNICO <i>Astronotus ocellatus</i> (PERCIFORMES, CICHLIDAE) INTRODUZIDO NOS EVERGLADES, FLÓRIDA, EUA	 79
SUMÁRIO.....	80
RESUMO	81
INTRODUÇÃO.....	82
MATERIAL E MÉTODOS.....	84
Coleta e aclimação	84
Delineamento experimental.....	84
Experimento de tolerância à salinidade abrupta	85
Experimentos de salinidade crônica + temperatura	85
Experimentos de Crítical Thermal Maximum e Minimum (CTMáx e CTMin)	86
Análise Estatística	86
RESULTADOS	86
Experimento de tolerância à salinidade abrupta	87
Experimentos de salinidade crônica + temperatura.....	88
Experimentos de CTMáx e CTMin	90
DISCUSSÃO	91
REFERÊNCIAS	96
 CONCLUSÕES GERAIS	 103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1 - Temperatura crítica e expressão da proteína de choque térmico (HSP70) em peixes teleósteos de diferentes ambientes aquáticos	18
<u>Figura 1</u> - Espécies estudadas	25
<u>Figura 2</u> - Expressão de HSP70	33
<u>Tabela 1</u> - Temperatura Crítica Máxima (CTMáx)	29
<u>Tabela 2</u> - Comparação entre as espécies com valores de P	29
Capítulo 2 - Tolerância térmica e expressão de hsp70 do peixe Amazônico Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	48
<u>Figura 1</u> - Espécie estudada	55
<u>Figura 2</u> - Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase	60
<u>Figura 3</u> - Expressão de HSP70 em <i>C. macropomum</i>	61
<u>Figura 4</u> - Expressão de mRNA HSP70 muscular em <i>C. macropomum</i>	62
Capítulo 3 - Salinity and temperature tolerance of amazon Oscar <i>Astronotus ocellatus</i> (Perciformes, Cichlidae) introduced in Everglades, Florida, USA	78
<u>Figura 1</u> - Espécie estudada	83
<u>Figura 2</u> - Sobrevivência de <i>A. ocellatus</i> em transferência abrupta a salinidade ...	87
<u>Figura 3</u> - Sobrevivência de <i>A. ocellatus</i> expostos cronicamente a salinidade	88
<u>Tabela 1</u> - Análise de Two-way ANOVA	90
<u>Tabela 2</u> - Temperatura Crítica Máxima (CTMáx) e Mínima (CTMin)	90

RESUMO GERAL

A temperatura é um dos fatores abiótico que mais influencia na fisiologia de organismos ectotérmicos aquáticos. A determinação da temperatura crítica máxima ou mínima (CTMáx ou CTMin) e a avaliação de parâmetros fisiológicos como a expressão de proteínas de choque térmico (HSP70) e a atividade de enzimas (Na^+K^+ -ATPase e H^+ -ATPase) são ferramentas importantes na compreensão dos limites fisiológicos dos peixes e de suas respostas frente ao estresse térmico. A comparação das tolerâncias à variações de temperatura de espécies filogeneticamente próximas ou que vivem em ambientes aquáticos similares e a interação de fatores abióticos estressores em testes experimentais, como temperatura e salinidade, fornecem dados importantes sobre a distribuição atual e possível dispersão das espécies, além de ajudar a compreender padrões ecofisiológicos. Foram avaliadas as Temperaturas Críticas Máximas dos peixes teleóteos: os baiacus marinhos/estuarinos *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi*, e os dulcícolas de riachos de região temperada *Rhamdia quelen* e *Hypostomus ancistroides*, e os peixes Amazônicos *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus*. As espécies de baiacus de mesmo gênero apresentaram diferentes CTMáx, sendo *S. greeleyi* a espécie mais vulnerável à elevação crítica de temperatura quando comparada a todas as demais espécies, e *S. testudineus* apresentando maiores valores de CTMáx em relação a *S. greeleyi*. Essa diferença de tolerância térmica em espécies filogeneticamente próximas pode ocorrer devido aos diferentes habitats ocupados pelas duas espécies, enquanto *S. greeleyi* encontra-se na região praiana dos estuários em águas rasas, *S. testudineus* além das mesmas águas rasas, também consegue invadir desembocaduras de rios chegando a áreas de água doce, e essa ocupação de um ambiente mais instáveis e variável pode ter conferido à *S. testudineus* uma maior capacidade de resistência à alterações ambientais como de temperatura. Enquanto as espécies dulcícolas *R. quelen* e *H. ancistroides*, de ambientes similares de rios e riachos temperados, apresentaram tolerâncias térmicas similares, o mesmo ocorrendo para *C. macropomum* e *A. ocellatus* que habitam ambas águas quentes da bacia Amazônica, apesar de não serem filogeneticamente próximos, podem possuir essa semelhança de temperaturas críticas devido à essa ocupação de ambientes similares, ou seja, possuem histórias térmicas e evolutivas em ambientes similares o que lhe conferem resistências térmicas similares. Porém ao avaliar a expressão de HSP70 em diferentes tecidos das espécies não foi possível encontrar um padrão de expressão geral que se relacionou às

diferentes aclimações, filogenias ou ambientes naturais, apenas pôde-se comprovar que a resposta celular de ativação dessa proteína de estresse é espécie-específica e tecido-específica. Apesar dessa falta de padrão de expressão, é possível verificar que as proteínas estão presentes em todos os tecidos analisados (músculo, brânquias e fígado), com expressão significativa que pode indicar que as espécies já possuem uma expressão suficientemente alta para responder a estressores, ou possui alterações de expressões pontuais, em determinadas condições e tecidos, que podem justificar a tolerância das espécies a variações térmicas. Na espécie *C. macropomum* foram avaliadas as enzimas Na^+K^+ -ATPase e H^+ -ATPase durante a alteração de temperatura, e a não alteração da atividade de Na^+K^+ -ATPase pode estar ligado ao caráter osmorregulatório da enzima, não sofrendo alterações em choques térmicos, enquanto a elevação da enzima H^+ -ATPase com o aumento térmico deveu-se possivelmente pela influencia da temperatura na cinética enzimática e na alteração de estruturas celulares ligadas as respostas fisiológicas. Quando foi avaliada a tolerância a salinidade abrupta e crônica em *A. ocellatus*, e a interação do estresse térmico e salino, foi possível observar que essa espécie pode tolerar elevações na salinidade que chegam a até 20 ppt em águas quentes ($\sim 28^\circ\text{C}$) durante dois dias, e até 16 ppt durante um mês, porém quando em águas frias (18°C) sua tolerância diminui drasticamente, suportando apenas 10 horas em 20 ppt, e cerca de 9 dias em salinidades de até 14 ppt. Apesar de o frio afetar a tolerância salina de *A. ocellatus*, a espécie tem um alto potencial de dispersão em águas salobras frias em questão de horas, e em águas salobras quentes durante vários dias. A temperatura mostrou-se de fato um fator importante na compreensão da distribuição e potencial dispersão dos teleósteos estudados. Os padrões de tolerância térmica encontrados para essas espécies, assim como seus mecanismos fisiológicos para responder às variações térmicas, possibilita entender a como elas ocuparam os seus ambientes nativos, agrega dados à suas histórias térmicas e faz inferências sobre suas adaptações e possíveis dispersões.

ABSTRACT

Temperature is one of the most influent abiotic factors in the physiology of aquatic ectothermic organisms. The determination of the Critical Thermal Maximum or Minimum (CTM_{ax} or CTM_{in}) and the evaluation of physiologic parameters such as the expression of heat shock proteins (HSP70) and the enzymatic activity (Na⁺ K⁺-ATPase and H⁺-ATPase), are important tools to the understanding of the physiological limits of fish and their response to heat stress. Comparing the tolerances to temperature variations of species phylogenetically close or the ones that live in similar aquatic environments, and also testing the interaction of abiotic stress factors, such as temperature and salinity, in experimental works, provide important data on the species distribution and its possible spread, and help understand ecophysiological patterns. The Critical Thermal Maximum of teleosts fish were assessed pairwise: marine / estuarine pufferfishes *Sphoeroides testudineus* and *Sphoeroides greeleyi*, freshwater fishes of temperate creeks *Rhamdia quelen* and *Hypostomus ancistroides*, and Amazon fishes *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. Same genus baicus species presented different CTM_{ax}, being *S. greeleyi* the most vulnerable species to high critical temperature when compared to all the other species, and *S. testudineus* showed higher values in CTM_{ax} compared to *S. greeleyi*. This difference in thermal tolerance in phylogenetically closely related species can occur due to the differences in the habitats occupied by the two species, while *S. greeleyi* is in estuarine seaside region with shallow water. *S. testudineus* occupied also estuarine shallow waters but can disperse through rivers' outfalls, reaching areas of freshwater and with a more unstable and changing environment, what may have conferred to *S. testudineus* a greater resilience to environmental changes, such as temperature, than *S. greeleyi*. The freshwater species *R. quelen* and *H. ancistroides* that in nature usually inhabit similar environments of tempered rivers and streams, showed similar thermal tolerances, same pattern showed for *C. macropomum* and *A. ocellatus* both inhabiting warm waters of the Amazon basin. Although these species are not phylogenetically close they probably showed these similarities on temperature's tolerance due to the occupation of similar environments, ie., they have thermal and evolutionary histories in a similar environment that influences in the similarities of thermal resistance. When assessing to the HSP70 expression in different tissues of species we could not find a general pattern of expression that related to different temperature acclimations, phylogenies or natural

environments, we only concluded that the cellular response of HSP70 activation is species-specific and tissue-specific. Despite this lack of expression pattern, it is possible to observe that the stress protein presented significant expression in all analyzed tissues (muscle, gills and liver), which may indicate that the species already have a high enough expression to respond to stressors, or had specific changes on expression under certain conditions and tissues, which can justify the tolerance of the species to thermal variations. For *C. macropomum* the enzymes $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase and H^+ -ATPase were analyzed during the temperature change. No change in $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase activity were detected which may be attached to the enzyme osmoregulatory character that may lead to it does not undergo changes during thermal shocks. The raise in H^+ -ATPase activity with thermal increase possibly was due to the influence of temperature on enzyme kinetics and changes in cellular structures associated to physiological responses. When we evaluated the tolerance to abrupt and chronic salinity changes in *A. ocellatus*, and the interaction of heat and salt stress, we observed that the species can tolerate increases in salinity that reach 20 ppt in hot water ($\sim 28^\circ \text{C}$) for two days, and up to 16 ppt over a month, but when in cold water (18°C) the species drastically reduces tolerance, supporting only 10 hours in 20 ppt and about 9 days in 14 ppt. Despite the cold affect the salt tolerance of *A. ocellatus*, the species has a high potential for dispersion in cold brackish water in a matter of hours, and in brackish warm waters for several days. The temperature was proved to be indeed an important factor to understanding the distribution and potential dispersion of the studied teleost. The thermal tolerance patterns found for these species, as well as its physiological mechanisms to respond to temperature changes, enables understand how they occupied their native environments, adds data to their thermal histories and makes inferences about their adaptations and possible dispersions.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos ecofisiológicos visam compreender as respostas dos organismos frente a alterações ambientais, que vão desde o nível de organismos, compreendendo órgãos, sistemas, células, moléculas, ao âmbito populacional, de comunidades e ecossistemas (Gaston et al. 2009, Eddy e Handy 2012, Cooke et al. 2013). Integrando a fisiologia com a ecologia, é possível compreender distribuição e abundância das espécies em diferentes ambientes, com base em suas tolerâncias ambientais (Spicer e Gaston 1999, Franklin e Seebacher 2012, Cooke et al. 2013).

A tolerância à temperatura é um dos fatores abióticos mais relevantes para compreensão da distribuição e dispersão de peixes, além de fornecer uma base importante sobre as adaptações sofridas pelos animais que justificam as conquistas dos ambientes naturais (Somero 2005, Hofmann e Todgham 2010, Schulte 2011). A temperatura afeta diretamente os fenótipos dos organismos, o que gera pressões seletivas no comportamento, fisiologia, história de vida e ecologia (Willmer et al. 2005, Schulte 2011). Em uma escala evolucionária, os peixes se adaptaram geneticamente a desempenhar suas funções ótimas dentro de um intervalo de temperatura nos quais eles rotineiramente estão expostos em seus ambientes (Somero 2010, Schulte 2011, Eddy e Handy 2012).

Em geral os peixes teleósteos são animais pecilotérmicos, ou seja, sua temperatura corporal varia de acordo com a temperatura do ambiente, e ectotérmicos, ou seja, a fonte de calor do corpo se deriva do ambiente externo (Johnston e Bennett 1996, Willmer et al. 2005). Para esses animais o grande desafio é a perda rápida de calor para o meio aquático, na medida em que o sangue passa pelas brânquias (Schulte 2011). Peixes que vivem dentro de uma ampla faixa de temperatura são chamados de euritérmicos, enquanto as espécies que vivem em uma faixa estreita de temperatura são chamadas estenotérmicas (Willmer et al. 2005, Schulte 2011).

A maioria dos ectotérmicos possui a habilidade de se aclimatar às variações térmicas no seu ambiente, assim indivíduos com diferentes histórias térmicas possuem diferentes sensibilidades à temperatura (Schulte et al. 2011). Os efeitos da mudança de temperatura no animal podem ser negativos, disruptivos para a homeostase e possivelmente letais. As respostas ao estresse térmico são tentativas adaptativas de

restaurar a homeostase, ou minimizar a probabilidade de letalidade (Willmer et al. 2005, Schulte 2011).

A temperatura afeta profundamente os sistemas biológicos em todos os níveis de organização, desde moléculas a ecossistemas (Fry 1971, Hochachka e Somero 2002, Willmer et al. 2005, Schulte et al. 2011). Alterações na temperatura podem modificar as taxas de reações biológicas e afetam a formação e estabilização de interações intermoleculares. Elevações da temperatura interna podem desestabilizar ligações de hidrogênio, ligações iônicas, e interações de van der Waal, porém podem estabilizar interações hidrofóbicas (Somero 1995, Fields 2011). Em geral aumentos na temperatura tendem a desestabilizar proteínas a ponto de eventualmente elas desnaturarem ou se tornarem não funcionais (Somero 1995, Willmer et al. 2005, Fields 2011). Esses efeitos são tão profundos que os organismos desenvolveram uma variedade de estratégias para evitar ou compensar as alterações (Schulte 2011).

Pelo fato de a maioria dos peixes ser ectotérmicos, a temperatura influencia de forma crítica sua distribuição e abundância, determina tanto os limites absolutos onde os peixes podem viver, como também desempenha um papel importante na sua habilidade de lidar com esses limites (Willmer et al. 2005, Schulte 2011). À medida que a temperatura ambiental muda, a maioria dos ectotérmicos ativam respostas internas envolvendo reações bioquímicas e fisiológicas, para manter a homeostase (Somero 1995, Willmer et al. 2005). A tolerância à variação de temperatura pode diferir de acordo com as espécies, a temperatura de aclimação, o tempo de exposição, e a interação com outros tipos de estresse abióticos, como salinidade (Das et al. 2005, Ficke et al., 2007, Beitinger e Lutterschmidt 2011).

A quantificação da tolerância térmica de peixes, especialmente se tratando de temperaturas letais, é um fator fundamental para a determinação dos potenciais impactos biológicos que elevações na temperatura podem causar nos ecossistemas, comunidades, populações e espécies (Pörtner 2002, Schulte 2011). A temperatura crítica máxima ou mínima (Crítical Thermal - CTMáx ou CTMín) pode ser definida como o ponto no qual as atividades locomotoras do animal se tornam desorganizadas e ele perde a habilidade de escapar de condições determinantes à sua sobrevivência, ou seja, que podem ser letais (Cox 1974, Beitinger et al. 2000, Carveth et al. 2006, Beitinger e Lutterschmidt 2011).

A metodologia da CTM se caracteriza pelo aumento ou diminuição constante e gradual de temperatura, em organismos previamente aclimatados a temperaturas constantes, com uma variação de temperatura rápida o suficiente para simular uma mudança de temperatura ambiental e evitar a reaclimação do animal, mas lenta o bastante para permitir que a temperatura corporal acompanhe a temperatura ambiental (como acontece com pecilotérmicos ectotérmicos), atingindo um ponto final pré-letal ou letal (Cox 1974, Beitinger et al. 2000, Beitinger e Lutterschmidt 2011). Pesquisas de CTM são ecologicamente relevantes, pois os peixes geralmente enfrentam temperaturas críticas na natureza, tanto temporalmente quanto espacialmente, em eventos naturais ou antrópicos, de flutuações agudas que ultrapassam seus limites ótimos (Brett 1956, Hutchison 1976, Carveth et al. 2006, Schulte 2011, Rezende et al. 2014).

As células possuem uma variedade de mecanismos que ajudam a estabilizar as proteínas e reduzir os efeitos desnaturantes causados pela elevação de temperatura (Willmer 2005). O mecanismo mais conhecido de resposta ao estresse térmico nas células é a expressão de uma família de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins ou HSP) que ajudam a estabilizar e redobrar proteínas em processo de desnaturação ou desdobramento (Feder e Hofmann 1999, Iwama *et al.* 2004, Hoffman 2005, Hofmann e Todgham 2010).

As HSPs são um dos grupos de proteínas mais conservados na natureza, ocorrendo de bactérias até humanos (Feder e Hofmann 1999, Dahlhoff 2004). Elas são chamadas de chaperonas, pois interagem com outras proteínas promovendo seu dobramento, estabilização e ativação, ou seja, as HSPs não são somente importantes durante um evento de estresse, mas também estão presentes constitutivamente nas células, ajudando constantemente no dobramento e carregamento de proteínas (Bensaude et al. 1990, Feder e Hofmann 1999, Hofmann 2005, Evgen'ev et al. 2014). Apesar das HSPs terem sido descobertas e nomeadas como proteínas em resposta ao estresse térmico, na verdade elas são atualmente conhecidas como proteínas de estresse, pois podem ser induzidas frente a uma gama de estressores que vão desde temperatura, salinidade e pH, à poluentes e tóxicos (Feder e Hofmann 1999, Iwama *et al.* 2004, Hoffman 2005, Currie 2011).

Quando os limites térmicos dos peixes são atingidos, ou ultrapassados, sua capacidade aeróbica é reduzida, as proteínas começam a se agregar e desdobrar, e as membranas celulares começam a se separar (Fink 1999, Iwama et al. 2004, Place e

Hofmann 2005). Para lidar com esses aumentos de temperatura que atingem o limiar de tolerância, os peixes, em geral, ativam rapidamente as HSPs induzíveis nas suas células para proteger as proteínas e membranas, auxiliando na prevenção de agregações, induzindo o redobramento apropriado ou marcando proteínas que não podem ser mais reparadas para que sejam desnaturadas, reduzindo os danos causados pela temperatura (Feder e Hofmann 1999, Willmer et al. 2005, Currie 2011). Essa resposta fenotípica geralmente é considerada adaptativa, pois a indução de HSPs pode estender a vida da célula e consequentemente do organismo, e essa indução é uma das respostas celulares severas usadas pelo peixe para lidar com o estresse térmico (Currie 2011).

As HSPs de peixes podem ser alteradas pela história térmica, a intensidade e magnitude do estresse térmico, a biogeografia da população e o estágio de desenvolvimento do peixe (Feder e Hofmann 1999, Currie 2011). Dependendo do nicho termal da espécie, os peixes podem apresentar variações diárias e sazonais de expressão de HSP e isso também pode afetar a indução da resposta da proteína ao choque térmico (Currie 2011). Apesar desse tempo de expressão, duração e intensidade da resposta ao choque térmico por HSPs ser bastante variável de acordo com o tecido analisado e também a espécie, a resposta ao choque térmico por HSPs é bastante relevante e crucial em peixes, demonstrando ser um fator importante frente a variações térmicas que poderiam ser letais (Feder e Hofmann 1999, Hofmann 2005, Kayhan e Duman 2010, Currie 2011).

Além das proteínas de estresse, a nível celular variações na temperatura também podem afetar a membrana celular e o funcionamento e a cinética das enzimas. As interações lipídicas que compõem as membranas celulares possuem um balanço delicado que pode ser facilmente afetado através de alterações de viscosidade e quebra das interações lipídeo-lipídeo e lipídeo proteínas quando submetidas a alterações de temperatura (Willmer et al. 2005, Moyes e Ballantyne 2011). As enzimas são suscetíveis a variações térmicas, podendo aumentar ou diminuir seu desempenho de acordo com a temperatura (Willmer et al. 2005, Fields 2011). Essas alterações afetam tanto a cinética enzimática quanto a membrana celular, e podem influenciar proteínas responsáveis pelo balanço osmo-iônico e pela regulação ácido-base (Robertson e Hazel 1999, Willmer et al. 2005, Evans e Claiborne 2009), como é o caso das enzimas Na^+K^+ -ATPase e a H^+ -ATPase (Metz et al. 2003, Freire e Prodócimo 2007).

Estudar as respostas fisiológicas dos animais frente a variações térmicas, através da expressão de HSPs e da avaliação das atividades de enzimas como a Na^+K^+ -ATPase e a H^+ -ATPase, auxilia na compreensão dos níveis de estresse causados nos peixes quando a temperatura está além do seu limite térmico, e também é importante para fazer inferências sobre o impacto das alterações ambientais na sobrevivência e na conquista de novos ambientes pelos organismos (Sorensen et al. 2003, Tomanek 2008, Hofmann e Todgham 2010). Ao definir os limites de tolerância térmica do peixe, é possível elucidar os padrões de ocupação e as condições que limitaram a vida em diferentes ambientes através do tempo evolutivo (Feder e Hofmann 1999, Portner 2002, Hochahcka e Somero 2002, Boussau et al. 2008).

Através de estudos que envolvem aspectos ecológicos, fisiológicos, evolutivos, busca-se gerar resultados robustos que reforcem o entendimento de variações na tolerância térmica dos animais, dos mecanismos utilizados para responder as variações e de como aspectos adaptativos e evolutivos estão agindo na determinação dos limites de tolerância das espécies (Hoffmann e Parsons 1997, Gaston et al. 2009, Somero 2010, Cooke et al. 2013). Entender as respostas fisiológicas e determinar as implicações ecológicas desses mecanismos é essencial para a geração de estudos biológicos de conservação das espécies em seu ambiente natural.

Nós buscamos testar a hipótese de que a capacidade de tolerância térmica está ligada às características filogenéticas e, portanto evolutivas, e não às adaptações ecológicas (temporalmente mais curtas). Seria esperado que as espécies ou taxa de uma mesma ordem estariam fisiologicamente mais relacionadas entre si independentemente do hábitat e região que ocupam. Porém, em contraste, pode ocorrer que as características fisiológicas não corresponderiam aos padrões filogenéticos e, portanto, os filtros ecológicos seriam muito fortes, sendo então que espécies de habitats similares possuiriam tolerâncias semelhantes independentemente de sua filogenia.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da elevação crítica de temperatura em peixes teleósteos de diferentes ambientes, e a resposta fisiológica ao estresse térmico. Fazer inferências das respostas adaptativas quanto ao ambiente e a proximidade taxonômica das espécies a fim de compreender padrões de adaptação ecofisiológica.

Objetivos Específicos

1. Determinar a Temperatura Crítica Máxima (CTMáx) e a Temperatura Crítica Letal (CTLetal) dos peixes teleósteos *Sphoeroides testudineus*, *Sphoeroides greeleyi*, *Rhamdia quelen*, *Hypostomus ancistroides*, *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus*;
2. Avaliar o papel da expressão da proteína de estresse HSP70 na resposta fisiológica ao estresse térmico dos peixes *S. testudineus*, *S. greeleyi*, *R. quelen*, *H. ancistroides* e comparar as tolerâncias a elevação de temperatura e a expressão de HSP70 dessas espécies levando em consideração as proximidades taxonômicas e/ou a ocupação de ambientes abioticamente variáveis (*S. testudineus* x *S. greeleyi* = marinhos-estuarinos / *R. quelen* x *H. ancistroides* = dulcícolas);
3. Analisar os efeitos da elevação crítica de temperatura no peixe amazônico *C. macropomum* através da análise da expressão da proteína HSP70 e da atividade das enzimas osmorregulatórias Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase e fazer inferência a sua ocupação em ambientes de águas tropicais quentes.
4. Determinar a tolerância térmica e salina do peixe amazônico *A. ocellatus* invasor nos Everglades Norte Americanos, para auxiliar na compreensão da sua ecofisiologia e alta capacidade de invasão de novos ambientes.

**CAPÍTULO 1 - TEMPERATURA CRÍTICA E EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70) EM PEIXES
TELEÓSTEOS DE DIFERENTES AMBIENTES AQUÁTICOS**

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Temperatura crítica e expressão da proteína de choque térmico hsp70 em peixes teleósteos taxonomicamente próximos de diferentes ambientes aquáticos.....	18
SUMÁRIO.....	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Coleta.....	25
Experimentos de Limite Térmico	26
Expressão de HSP70 por Western Blotting.....	27
Análise estatística	28
RESULTADOS	28
Temperatura Crítica.....	28
HSP70.....	29
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	40

RESUMO

A temperatura é um dos fatores abiótico que mais influencia na fisiologia de organismos ectotérmicos aquáticos. A avaliação da temperatura crítica máxima e expressão de proteínas de choque térmico (HSP70) auxiliam na determinação dos limites fisiológicos dos peixes e na compreensão de suas respostas frente ao estresse térmico. Ao comparar as tolerâncias de espécies filogeneticamente próximas, ou que vivem em ambientes aquáticos similares, é possível determinar padrões ecológicos e evolutivos quanto a resistência térmica que explicariam a conquista dos animais a esses ambientes. Foram avaliadas a CTMáx, a CTLetal e a expressão de HSP70 muscular, branquial e hepática, em peixes aclimatados por 5 dias em três temperaturas de aclimação: 20°C, 25°C e 30°C. Foram utilizadas quatro espécies: os baiacus congêneres marinhos/estuarinos *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi*, e os bagres dulcícolas *Rhamdia quelen* e *Hypostomus ancistroides*. A espécie marinha/estuarina *S. greeleyi* apresentou menores valores de CTMáx (33°C-35°C) e CTLetal (36°C-37°C) quando comparada as demais espécies. *Sphoeroides testudineus* apresentou CTMáx variando de 34°C-37°C e CTLetal de 36°C-39°C. As espécies dulcícolas apresentaram CTMáx e CTLetal semelhantes (CTMáx: 37°C e CTLetal: 38°C para *R. quelen*; e CTMáx entre 37°C-38°C e CTLetal entre 38°C-39°C para *H. ancistroides* em todas as temperaturas de aclimação) indicando similaridade na tolerância térmica das espécies de mesmo ambiente e filogenia similares. *R. quelen* foi a espécie que apresentou maior expressão de HSP70 nos três tecidos analisados. Em geral houve uma variação espécie-específica da expressão HSP70, com pouca alteração da expressão dentro de cada espécie nos animais expostos a diferentes temperaturas de aclimação e nos submetidos à CTMáx. Mesmo não havendo um padrão geral na expressão de HSP70, as diferentes espécies apresentaram níveis da proteína que reforçam a importância da HSP70 na resposta ao choque térmico, pois altos níveis de expressão, mesmo que constitutivos, indicam que a proteína está sendo constantemente ativada ou mantida como mecanismo de defesa das espécies em relação às variações térmicas do ambiente aquático. Pôde-se observar valores similares de tolerância à variações críticas de temperatura em espécies de ambientes similares, reforçando que a tolerância as flutuações de temperatura está ligada tanto a história evolutiva e como também a história térmica dos animais.

Palavras-chave: Tolerância térmica, ecofisiologia, teleósteos

INTRODUÇÃO

A avaliação das respostas fisiológicas e ecológicas dos animais frente a alterações ambientais abióticas como a temperatura auxilia na determinação da distribuição e abundância de espécies em diferentes ambientes, além de ser crucial para compreensão da biologia e fisiologia dos organismos (Spicer e Gaston, 1999, Gaston et al. 2009, Cooke et al. 2013). Esses estudos ecofisiológicos ajudam a entender a relevância da aclimação e da adaptação de processos fisiológicos às variações ambientais, além de auxiliarem no manejo e conservação de diversas populações (Pörtner e Farrell 2008, Buckley et al. 2011, Franklin e Seebacher 2012, Cooke et al. 2013).

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais influencia a sobrevivência de organismos aquáticos, especialmente ectotérmicos. Alterações térmicas podem causar desnaturação e desagregação de proteínas, além da degradação de processos enzimáticos (Willmer 2005, Mora e Maya 2006, Jiménez-Valverde e Lobo 2011). Elevações na temperatura também podem gerar aumento na taxa metabólica e por consequência uma maior necessidade de captação de oxigênio para suprir essa necessidade, exigindo uma demanda expressiva da capacidade aeróbica do organismo (Willmer et al. 2005, Jiménez-Valverde e Lobo 2011). Quando os animais enfrentam temperaturas que se distanciam da sua faixa ótima, os custos fisiológicos são altos, o que pode alterar o crescimento, reprodução, natação, fuga e forrageamento (Somero 2004, Willmer et al. 2005, Gaston et al. 2009).

Os limites ótimos de temperatura, bem como os limites térmicos críticos podem variar intra e inter especificamente, e são dependentes de fatores como genética, estágio de desenvolvimento e história térmica (Beitinger et al. 2000, Somero 2005). A capacidade do organismo de desenvolver diferentes fenótipos em respostas a condições ambientais, conhecida como plasticidade fenotípica, é, portanto, um importante processo de adaptação a novos ambientes ou locais que sofrem influências de alterações climáticas e antrópicas (Fordyce 2006, Jiménez-Valverde e Lobo 2011). Dentro dos limites térmicos não letais de temperatura, os peixes são capazes de lidar com mudanças graduais de temperatura que acontecem naturalmente em seus habitats, como variações diárias, flutuação de maré, regime de correntes e sazonalidade (Donaldson et al. 2008, Schulte 2011).

Aumentos rápidos ou inesperados na temperatura ambiental podem desencadear respostas fisiológicas e comportamentais essenciais para sobrevivência da espécie frente a esses distúrbios térmicos (Donaldson et al. 2008). Peixes estenotérmicos, com limites muito estreitos de tolerância a variações, ou os altamente euritérmicos, com um limiar bastante amplo de tolerância, geralmente vivem em ambiente onde estão expostos a condições próximas a seus limites térmicos, e podem possuir então uma habilidade limitada para aclimatarem a variações que excedam esses limites (Tomanek 2008, Sorensen et al. 2009, Tomanek 2010, Somero 2011).

O método de medição da temperatura crítica máxima auxilia na determinação dos limites de tolerância das espécies, demonstrando a resposta dos organismos a alterações abruptas e temporais na temperatura e auxiliando na compreensão da resistência térmica do animal (Hutchison 1976, Somero 2010, Beitinger and Lutterschmidt 2011). Os dados de temperatura crítica máxima são índices ecológicos relevantes, pois os peixes podem enfrentar na natureza flutuações de temperatura tanto temporais quanto espaciais, que podem exceder seus limites de tolerância, o que gera dados importantes sobre a distribuição e dispersão da espécie (Hutchison 1976, Currie et al. 1998, Ospina e Mora 2004).

Os efeitos da temperatura na expressão de proteínas do choque térmico (Heat-Shock Proteins ou HSP) em peixes têm sido apontados como um fator relevante na compreensão das respostas a variações térmicas (Iwama et al. 1998, Deane et al. 2002, Fangue et al. 2006, Madeira et al. 2012, 2014). A tolerância termal dos peixes e a indução de proteínas de choque térmico para responder ao estresse podem ser controladas pela genética do animal, ou serem modificadas por adaptações e aclimação (Basu et al. 2002, Somero 2005).

As proteínas de choque térmico desempenham um papel importante na manutenção da homeostase (Ackerman et al. 2000). A família das HSPs faz parte do complexo de proteínas conhecidos como chaperonas, responsáveis pelo dobramento e união de proteínas nativas que atuam na proteção contra desnaturação ou agregação das proteínas em situações desfavoráveis (Fink 1999, Place e Hofmann 2005, Hofmann 2005). Embora as proteínas de choque térmico possuam uma meia vida relativamente curta, seus níveis permanecem elevados em organismos mesmo após um longo tempo que o estressor já tenha sido removido (Basu et al. 2002). Estudos indicam que a expressão e indução de HSPs dependem da duração do estresse (Efremova et al. 2002) e

do tipo de tecido envolvido (Dyer et al. 1991, Wood et al. 1999, Cara et al. 2005, Wang et al. 2007). Dentre as famílias de HSPs, a HSP70 (70 kDa) é a mais comumente utilizada como biomarcador devido ao seu aumento rápido e significativo frente uma gama de estressores (Jonsson et al. 2006).

A indução da expressão de HSP quando existe um choque térmico está relacionada com os níveis de estresse que os organismos enfrentam naturalmente, e as variações naturais de temperatura geralmente são suficientes para gerar uma resposta de choque térmico (Roberts et al. 1997, Tomanek e Somero 1999, Buckley et al. 2001). A grande maioria dos peixes responde ao estresse térmico aumentando os níveis de HSP70, ou possuem níveis basais da proteína que são suficientemente altos para responder prontamente às variações ambientais (Currie e Tufts 1997, Currie et al. 2000, Lund et al. 2002, Ojima et al. 2005). Muitos estudos confirmam que a família das HSP70 está envolvida com a adaptação de animais aquáticos a condições adversas (Kregel 2002, Fangue et al. 2006, Roberts et al. 2010).

O emprego de ferramentas fisiológicas, como a determinação da expressão de HSP70, é relevante na compreensão dos limites térmicos, da distribuição, e das respostas ao estresse dos organismos, quando seu ambiente é bastante variável, sofre alterações antrópicas, ou alterações abióticas drásticas (Fangue et al. 2006, Tomanek 2008). Espera-se que peixes teleósteos de rios e riachos adaptados a temperaturas mais baixas, não suportem grandes aumentos de temperatura e expressem pequenas quantidades de proteínas de choque térmico. Já peixes marinhos/estuarinos, que vivem em um ambiente de águas com temperaturas mais amenas, suportariam maiores elevações na temperatura e a expressão das HSPs seria maior para resistir ao choque térmico severo.

O objetivo desse trabalho foi determinar a temperatura crítica máxima e a expressão de HSP70 em peixes teleósteos, e definir se há um padrão de resposta ao choque térmico entre espécies de peixes do mesmo gênero ou ordem e, portanto, a conquista do ambiente poderia ser explicada por características evolutivas, ou se ocorre um padrão de respostas entre espécies de habitats similares, independente da taxonomia, o que explicaria uma conquista do ambiente por adaptações ecológicas relacionadas a plasticidade fenotípica (temporalmente mais curtas).

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados os peixes baiacus marinho/estuarino (ambiente altamente variável) *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert 1900, Tetraodontiformes) e *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus 1758, Tetraodontiformes), e espécies da ordem Siluriformes dulcícolas (ambiente mais estável) *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824, Siluriformes) e *Hypostomus ancistroides* (Ihering 1911, Siluriformes). As espécies foram escolhidas pela proximidade taxonômica (baiacus congêneres e Siluriformes de hábito ambiental semelhante) e por habitarem ambientes com características diversas: *S. greeleyi* marinho/estuarino ocupando áreas praianas de rebentação, enquanto *S. testudineus* marinho/estuarino que ocupa preferencialmente desembocadura de rios e áreas estuarinas com maior aporte de água doce (Figueiredo e Menezes 2000), *R. quelen* é um peixe dulcícola que ocupa rios e tanques com características lênticas (Gomes et al. 2000), enquanto *H. ancistroides* habita preferencialmente rios e riachos lóticos, de correntezas (Casatti 2002).

O baiacu *S. greeleyi* é uma espécie comum do litoral brasileiro, habitando locais de baías junto à área rebentação e estuários com águas de pouca profundidade. (Figueiredo e Menezes 2000). A temperatura ambiental enfrentada por essa espécie em seu ambiente natural varia entre 18°C no inverno e 28°C no verão (Knoppers et al. 2004). O baiacu congênero *S. testudineus* habita ambiente similares aos de *S. greeleyi*, baías e estuários de águas rasas, porém essa espécie também pode penetrar áreas de água bastante diluída dentro de rios e desembocaduras do estuário (Figueiredo e Menezes 2000), e enfrenta temperaturas similares as de *S. greeleyi* no ambiente natural, também variando de 18°C a 28°C (Knoppers et al. 2004).

O jundiá *R. quelen* é um peixe que vive em fundos de rios e lagos, preferencialmente em águas calmas e com fundo de areia e lama (Gomes et al. 2000). É considerada uma espécie euritérmica por possuir uma amplitude de tolerância térmica de 15 a 34°C, quando alevino (Chippari-Gomes 1998), porém não existem estudos sobre sua faixa de tolerância térmica na fase juvenil e adulta. Em seu ambiente natural e em tanques de piscicultura pode enfrentar temperaturas que variam de 11 a 29°C (Souza 2002, Garcia et al. 2008). O cascudo *H. ancistroides* é um peixe de água doce que ocupa rios e riachos de correnteza com muitas rochas e vegetação (Lowe-McConnell 1999, Casatti 2002). Em seu ambiente natural pode enfrentar temperaturas que variam

anualmente de aproximadamente 19 a 25°C (Villwock et al. 2013). Há uma escassez de literatura sobre os dados ecológicos e fisiológicos desta espécie.



Figura 1. Espécies estudadas: (a) *S. greeleyi*; (b) *S. testudineus*; (c) *R. quelen*; (d) *H. ancistroides*. Fonte: FishBase/Google Images.

Coleta

Os indivíduos de *S. greeleyi* ($10,7 \pm 1,2$ cm) e *S. testudineus* ($13,2 \pm 0,8$ cm) foram coletados na Gamboa do rio Bagaçu na margem sul da Baía de Paranaguá, estado do Paraná, Brasil ($25^{\circ}\text{C}33'6.33''$ S, $48^{\circ}\text{C}23'41.63''$ W). *S. greeleyi* foi coletado na parte rasa da praia, próximo a desembocadura do rio, através de rede de arrasto manual e *S. testudineus* foi coletado com redes de espera tipo fyke instaladas no canal adentro da desembocadura, no período de maré sizígia baixa, e deixadas por cerca de 5 horas até o próximo pico da maré alta. Os animais coletados foram transferidos para galões de plástico com aeração constante e transportados até o laboratório em Curitiba.

Os indivíduos de *R. quelen* ($14,3 \pm 0,7$ cm) foram obtidos com criador no CEASA-PR (Peixes e Peixes Ltda.), oriundos de pisciculturas da região de Curitiba, Paraná. A espécie *H. ancistroides* ($17,1 \pm 0,2$ cm) foi coletada no rio Mourão ($24^{\circ}\text{C}07'19.2''$ S, $52^{\circ}\text{C}19'22.3''$ W), próximo à cidade de Campo Mourão, Paraná, em uma área com muitas rochas e correnteza. Foram utilizadas redes de espera simples, alocadas nas margens do rio e deixadas por cerca de 2 horas. Os peixes foram coletados e colocados em galões plásticos com aeração constantes e transportados até o laboratório. O transporte dos animais foi realizado em galões de água com aeração constante e a temperatura monitorada. No laboratório os animais foram aclimatados por

duas semanas em aquários controles com água doce para os siluriformes dulcícolas e água marinha com salinidade de 30 ppt para os baiacus marinhos/estuarinos, com temperatura aproximada de 20-23°C e aeração constante. Durante o período de aclimação os peixes foram alimentados três vezes por semana com ração comercial para os siluriformes e carne bovina moída para os baiacus.

Experimentos de Limite Térmico

Os animais foram colocados em três aquários diferentes (n=10 por aquário) partindo de uma temperatura de 20°C. Um grupo foi mantido em 20°C e os demais foram submetidos a uma elevação gradual de temperatura até atingirem temperaturas de aclimação de 25°C e 30°C. Os animais foram mantidos nas três temperaturas de aclimação (20, 25 e 30°C) durante 5 dias. Após esse período, os animais foram transferidos para aquários individuais. Para cada temperatura de aclimação 20°C, 25°C e 30°C, foram mantidos 10 peixes controles, apenas aclimatados a temperatura em questão, e 10 peixes foram submetidos à elevação crítica de temperatura (testes de CTMáx) a partir de cada temperatura de aclimação (para cada temperatura de aclimação foram utilizados 20 peixes, 10 controles e 10 submetidos à CTMáx). O limite térmico foi medido através do teste de Temperatura Crítica Máxima ou CTMáx (baseado em Beitinger et al. 2000 e Prodócimo e Freire 2001), onde a temperatura da água foi elevada a uma taxa constante de 2°C/hora e a temperatura crítica máxima e a temperatura crítica letal (CTLetal) foram determinadas através das respostas dos animais. A CTMáx era definida por uma situação situação pré-letal letal do peixe, onde era relatada perda de equilíbrio, colapso sensorial, desorientação e falta de resposta a estímulos mecânicos. A CTLetal foi definida como o momento em que o peixe cessou os movimentos operculares e apresentou total perda de resposta (Beintiger et al. 2000, Beitinger e Lutterschmidt 2011). A CTMáx foi definida pela média das temperaturas na qual cada indivíduo alcançou seu ponto crítico e a CTLetal foi considerada a temperatura em que ocorreu 100% de mortalidade (Baseado em Beitinger et al. 2000).

Após os experimentos os animais foram anestesiados em benzocaína (80mg/L) e um fragmento de músculo, arcos brânquias do lado direito e um fragmento de fígado foram retirados e congelados em freezer -80°C para análise da expressão das proteínas de estresse HSP70.

Expressão de HSP70 por Western Blotting

Os fragmentos de músculo, brânquia e fígado obtidos nos experimentos foram homogeneizados em gelo durante cinco minutos, com tampão de homogeneização (HEPES 20mM, NaCl 15mM, Triton X-100 1%, NP-40 1%) e inibidores de protease (Benzamidina 20mM, EDTA 10mM, Iodocetamida 10mM, Pepstatina 5µg/mL, 1,10 Fenantrolina 5mM, PMSF 2mM), utilizando o homogeneizador Tecnal TE-103. Após a homogeneização o material foi centrifugado a 16000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi congelado a -80°C. A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi dosada utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976), com leitura em microplacas no leitor de Elisa a 595nm.

A detecção da expressão das proteínas foi feita a partir do ensaio imunológico por Western Blot de acordo com Gutierre et al. (2014). Alíquotas do extrato de proteínas (contendo 200 mg de proteína total) foram diluídas em tampão de amostra e submetidas a um gel de corrida (acrilamida 10%) e um gel de empilhamento (acrilamida 5%). Após a corrida, os peptídeos do gel foram transferidos para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blot com a transferência realizada em corrente de 120 mA e 25 mV, durante aproximadamente 16 horas. A membrana então foi retirada e lavada com tampão TBST (120mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4 and 0.05% Tween-20) 10 minutos, e após a lavagem foi bloqueada em leite em pó com baixo teor de gordura 5% diluído em TBST por 60 minutos. Em seguida, o material foi incubado por duas horas em anticorpo primário HSP70 mouse (1:1000, BD transduction laboratories TM, San Jose, CA, USA). Posteriormente a membrana foi lavada cinco vezes, por cinco minutos, com tampão TBST e incubada com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina, (1:1000, Sigma Aldrich, Sant Louis, MO, USA) por duas horas. A membrana foi novamente lavada três vezes com tampão TBST por cinco minutos e em seguida incubada com solução de cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium) (Sigma Aldrich), permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas de marcação das proteínas. A expressão de HSP70 foi quantificada através da análise da intensidade relativa de cinza das bandas, utilizando o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/>) e expressa em unidades arbitrárias.

Análise estatística

As análises estatísticas da CTMáx foram feitas através de two-way ANOVA seguida de *post hoc* de Holm-Sidak, utilizando como fatores de comparação as espécies (*S. greeleyi* x *S. testudineus* x *R. quelen* x *H. ancistroides*) e as temperaturas de aclimação (20°C, 25°C e 30°C). Para a análise da expressão de HSP70 também foi realizado o teste de two-way ANOVA com *post hoc* de Holm-Sidak, utilizando como fatores de comparação as condições experimentais (peixes controles apenas submetidos à aclimação nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C x peixes experimentais submetidos à CTMáx) e as temperaturas de aclimação (20°C x 25°C x 30°C), para cada tecido separadamente. O teste de three-way ANOVA foi utilizado para comparar as espécies (*S. greeleyi* x *S. testudineus* x *R. quelen* x *H. ancistroides*) em cada temperatura de aclimação (20°C x 25°C x 30°C) e para cada condição (controles x CTMáx). Foi considerado um limite de significância de 0,05 para todas as análises.

RESULTADOS

Temperatura Crítica

As espécies marinhas/estuarinas *S. greeleyi* e *S. testudineus* e as dulcícolas *R. quelen* e *H. ancistroides*, apresentaram CTMáx variando de 34 a 37°C e CTLetal variando de 36°C a 39°C (Tab. 1). O baiacu *S. greeleyi* foi a espécie mais vulnerável ao estresse térmico, apresentando os menores valores de CTMáx e CTLetal comparados com as demais espécies, enquanto o cascudo *H. ancistroides* e o bagre *R. quelen* apresentaram as maiores temperaturas de CTMáx em relação aos baiacus. *H. ancistroides* apresentou a maior CTLetal comparado as demais espécies. As espécies dulcícolas *H. ancistroides* e *R. quelen* não apresentaram diferença de CTMáx nas variadas temperaturas de aclimação (20°C, 25°C e 30°C). O baiacu *S. testudineus* apresentou um aumento CTMáx acompanhando o aumento da temperatura de aclimação, e *S. greeleyi* apresentou diminuição da CTMáx na aclimação de 25°C em relação às demais temperaturas de aclimação de 20°C e 30°C ($P < 0,05$) (Tab. 1).

Tabela 1. Tolerância térmica das espécies de peixes submetidas ao experimento de Temperatura Crítica Máxima (CTMáx). CTMáx expressa em Média \pm Erro Padrão ($^{\circ}\text{C}$), e CTLetal em valores absolutos (temperatura onde houve 100% de mortalidade). Letras “a” e “b” indicam diferença entre as temperaturas de aclimação para a mesma espécie. Letras “d”, “e”, “f” e “g” indicam diferença entre as espécies para uma mesma temperatura de aclimação. $P < 0,05$.

	CTMáx			CTLetal		
	20 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	20 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$
<i>Rhamdia quelen</i>	37,0 \pm 0,2 ^{a d}	37,1 \pm 0,3 ^{a d}	37,2 \pm 0,4 ^{a d}	38	38	38
<i>Hypostomus ancistroides</i>	37,0 \pm 0,3 ^{a d}	37,6 \pm 0,3 ^{a d}	38,4 \pm 0,2 ^{a d}	38	39	39
<i>Sphoeroides greeleyi</i>	35,4 \pm 0,4 ^{a e}	33,9 \pm 0,8 ^{b e}	35,3 \pm 0,3 ^{a e}	36	37	36
<i>Sphoeroides testudineus</i>	34,1 \pm 0,4 ^{a f}	37,6 \pm 0,5 ^{b d}	37,6 \pm 0,3 ^{b d}	36	39	38,5
<i>Colossoma macropomum</i> *	-	40,9 \pm 0,6 ^{a f}	41,9 \pm 0,3 ^{a f}	-	43	43
<i>Astronotus ocellatus</i> *	-	40,8 \pm 0,2 ^{a f}	41,1 \pm 0,1 ^{b g}	-	41	41,5

* Dados obtidos nos demais capítulos da tese.

HSP70

A expressão de HSP70 apresentou variabilidade entre as espécies estudadas, e também entre os tecidos analisados (músculo, brânquia e fígado). *Rhamdia quelen* foi a espécie com maiores níveis de HSP70 nos três tecidos analisados quando comparada as demais espécies estudadas ($P < 0,05$). As espécies *S. greeleyi*, *S. testudineus* e *H. ancistroides* apresentaram expressão de HSP70 similar no músculo e no fígado ($P > 0,05$). No entanto, a expressão de HSP70 nas brânquias *S. greeleyi* apresentou menores valores que *S. testudineus* ($P < 0,05$) e ambas espécies de baiacus apresentaram expressões de HSP70 branquial similares à expressão de *H. ancistroides* (Tab. 2).

Tabela 2. Comparação da expressão de HSP70 no músculo, brânquia e fígado entre as espécies *S. greeleyi*, *S. testudineus*, *R. quelen* e *H. ancistroides* aclimatadas as temperaturas de 20 $^{\circ}$, 25 $^{\circ}$ e 30 $^{\circ}\text{C}$ (controle = cinza) e submetidos ao teste de CTMáx (experimental). Foram utilizados os valores de P para comparação entre as espécies na mesma condição experimental, com um índice de significância de $P < 0,05$. Diferenças estatísticas estão indicadas com *.

MÚSCULO				
20 $^{\circ}\text{C}$	<i>S. greeleyi</i>	<i>S. testudineus</i>	<i>R. quelen</i>	<i>H. ancistroides</i>
<i>S. greeleyi</i>	-	0,071	< 0,001*	0,004*
<i>S. testudineus</i>	0,276	-	< 0,001*	0,283
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	0,454	0,146	< 0,001*	-
25 $^{\circ}\text{C}$	<i>S. greeleyi</i>	<i>S. testudineus</i>	<i>R. quelen</i>	<i>H. ancistroides</i>
<i>S. greeleyi</i>	-	0,023*	< 0,001*	< 0,001*
<i>S. testudineus</i>	0,089	-	< 0,001*	0,002*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	0,070	< 0,001*	< 0,001*	-
30 $^{\circ}\text{C}$	<i>S. greeleyi</i>	<i>S. testudineus</i>	<i>R. quelen</i>	<i>H. ancistroides</i>
<i>S. greeleyi</i>	-	0,096	< 0,001*	0,115
<i>S. testudineus</i>	< 0,001*	-	< 0,001*	0,006*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	-

BRÂNQUIA				
20° C	<i>S. greeleyi</i>	<i>S. testudineus</i>	<i>R. quelen</i>	<i>H. ancistroides</i>
<i>S. greeleyi</i>	-	0,032*	< 0,001*	0,237
<i>S. testudineus</i>	0,152	-	< 0,001*	< 0,001*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	< 0,001*	0,063	< 0,001*	-
25° C				
<i>S. greeleyi</i>	-	0,211	< 0,001*	0,087
<i>S. testudineus</i>	0,101	-	< 0,001*	0,008*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	0,045*	0,708	< 0,001*	-
30° C				
<i>S. greeleyi</i>	-	0,573	< 0,001*	0,021*
<i>S. testudineus</i>	0,845	-	< 0,001*	0,006*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	< 0,001*	0,023*	< 0,001*	-
FÍGADO				
20° C	<i>S. greeleyi</i>	<i>S. testudineus</i>	<i>R. quelen</i>	<i>H. ancistroides</i>
<i>S. greeleyi</i>	-	0,056	< 0,001	0,025
<i>S. testudineus</i>	0,003*	-	< 0,001	0,526
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001	-	< 0,001
<i>H. ancistroides</i>	0,017*	0,843	< 0,001	-
25° C				
<i>S. greeleyi</i>	-	0,039	< 0,001*	0,088
<i>S. testudineus</i>	0,020*	-	< 0,001*	0,001*
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	0,016*	0,079	< 0,001*	-
30° C				
<i>S. greeleyi</i>	-	< 0,001*	< 0,001*	0,001*
<i>S. testudineus</i>	0,239	-	< 0,001*	0,412
<i>R. quelen</i>	< 0,001*	< 0,001*	-	< 0,001*
<i>H. ancistroides</i>	0,014*	0,134	< 0,001*	-

No tecido muscular a expressão de HSP70 em *S. greeleyi* reduziu nos animais controles e nos submetidos à CTMáx aclimatados em 25°C e 30°C, quando comparados aos animais aclimatados em 20°C. Não houve diferença na expressão de HSP70 muscular entre animais expostos ao experimento de CTMáx e os controles em nenhuma das temperaturas de aclimação. Em *S. testudineus* os níveis de HSP70 muscular nos animais controles, apenas aclimatados às diferentes temperaturas, foi menor na temperatura de 30°C quando comparado aos de 20 e 25°C (Fig. 1A). Em *S. testudineus* houve diminuição de expressão de HSP70 nos animais controles aclimatados à 30°C quando comparados aos controles de 20°C e 25°C. Nos animais expostos à CTMáx a expressão de HSP70 no músculo foi menor nos peixes aclimatados à 25°C quando comparados aos de 20°C e 30°C. Nos animais aclimatados à 30°C a expressão de HSP70

muscular dos peixes expostos à CTMáx foi maior que nos aclimatados tanto a 20°C quanto a 25°C. E, 25°C houve menor expressão de HSP70 nos animais expostos à CTMáx comparados aos controles, e em 30°C a expressão dos animais da CTMáx foi maior que a dos controles (Fig. 2A).

Rhamdia quelen não apresentou variação da expressão de HSP70 no tecido muscular nos animais controles aclimatados às temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C; nos animais submetidos à CTMáx, apenas nos aclimatados à 25°C houve diminuição da expressão da proteína quando comparados aos de 20 e 30°C. A expressão de HSP70 dos animais expostos à CTMáx foi maior que a dos animais controles em todas as temperaturas de aclimação (Fig. 2A). *H. ancistroides* apresentou aumento na expressão de HSP70 muscular nos animais controles aclimatados à 25°C quando comparados aos aclimatados a 20°C e 30°C. Houve diminuição da expressão nos animais de 25°C expostos a CTMáx quando comparados aos de 30°C; apenas nos animais aclimatados à 25°C houve diminuição na expressão da proteína nos peixes submetidos à CTMáx quando comparados aos controles (Fig. 2A).

Nas brânquias analisadas, *S. greeleyi* apresentou uma diminuição na expressão de HSP70 em animais aclimatados à 30°C quando comparados ao aclimatados em 20°C e 25°C tanto para animais controles quando para os submetidos à CTMáx. Houve aumento da expressão de HSP70 branquial em animais expostos à CTMáx em relação aos animais controles em todas as temperaturas de aclimação (Fig. 1B). *S. testudineus* não apresentou diferença na expressão de HSP70 branquial entre animais controles e expostos à CTMáx. Não houve variação na expressão de HSP70 em animais controles e expostos à CTMáx aclimatados à 20°C quando comparados aos de 25°C e 30°C, porém os animais de 25°C apresentaram mais expressão que os de 30°C também para controles e CTMáx (Fig. 2B).

Indivíduos controle de *R. quelen* aclimatados a 30°C não apresentaram diferença na expressão de HSP70 branquial dos animais de 20°C e 25°C. Os exemplares aclimatados a 25°C tiveram maior expressão de HSP70 branquial que os de 20°C. Não houve variação na expressão para os peixes submetidos à CTMáx. Em 30°C a expressão de animais controles foi menor que a dos submetidos à CTMáx (Fig. 2B). Para a espécie *H. ancistroides* não houve variação na expressão de HSP70 branquial em nenhuma das condições (Fig. 2B).

No fígado, *S. greeleyi* apresentou diminuição da expressão de HSP70 com o aumento da temperatura de aclimação nos animais controles. Nos animais expostos à CTMáx, houve diminuição da expressão em 25°C comparado a 20°C e 30°C, e nos animais expostos à 30°C a expressão nos controles foi menor que nos animais submetidos à CTMáx (Fig. 2C). Em *S. testudineus* não houve diferença na expressão de HSP70 no fígado entre os animais controles e submetidos à CTMáx. Os animais aclimatados à 30°C apresentaram maior expressão de HSP70 nos controles quando comparados aos aclimatados a 20°C e 25°C. *S. testudineus* expostos à CTMáx e aclimatados à 20°C não apresentaram diferença de expressão de HSP70 do fígado comparados aos aclimatados à 25°C e 30°C, e a expressão nos animais expostos à CTMáx de 30°C foi maior que a dos expostos à 25°C (Fig. 2C).

A espécie *R. quelen* apresentou aumento da expressão de HSP70 no fígado dos animais controles aclimatados à 25°C e 30°C quando comparados aos de 20°C. Nos animais submetidos a CTMáx a expressão de HSP70 foi menor nos peixes de 25°C em relação aos de 20°C e 30°C. Na temperatura de 20°C animais controles apresentaram menor expressão de HSP70 do que os animais expostos à CTMáx; em 20°C e 30°C os animais expostos à CTMáx apresentaram valores de expressão maior que os animais controle, enquanto na temperatura de 25°C os controles apresentaram maior expressão quando comparados aos animais de CTMáx (Fig. 2C). *H. ancistroides* apresentou diminuição de expressão de HSP70 hepática nos animais controles aclimatados a 25°C e 30°C quando comparados aos aclimatados 20°C. No entanto, essa espécie apresentou aumento na expressão de HSP70 do fígado dos animais submetidos à CTMáx em 25°C e 30°C quando comparados aos de 20°C. Em 25°C e 30°C a expressão da proteína foi maior nos animais expostos à CTMáx quando comparados aos controles (Fig. 2C).

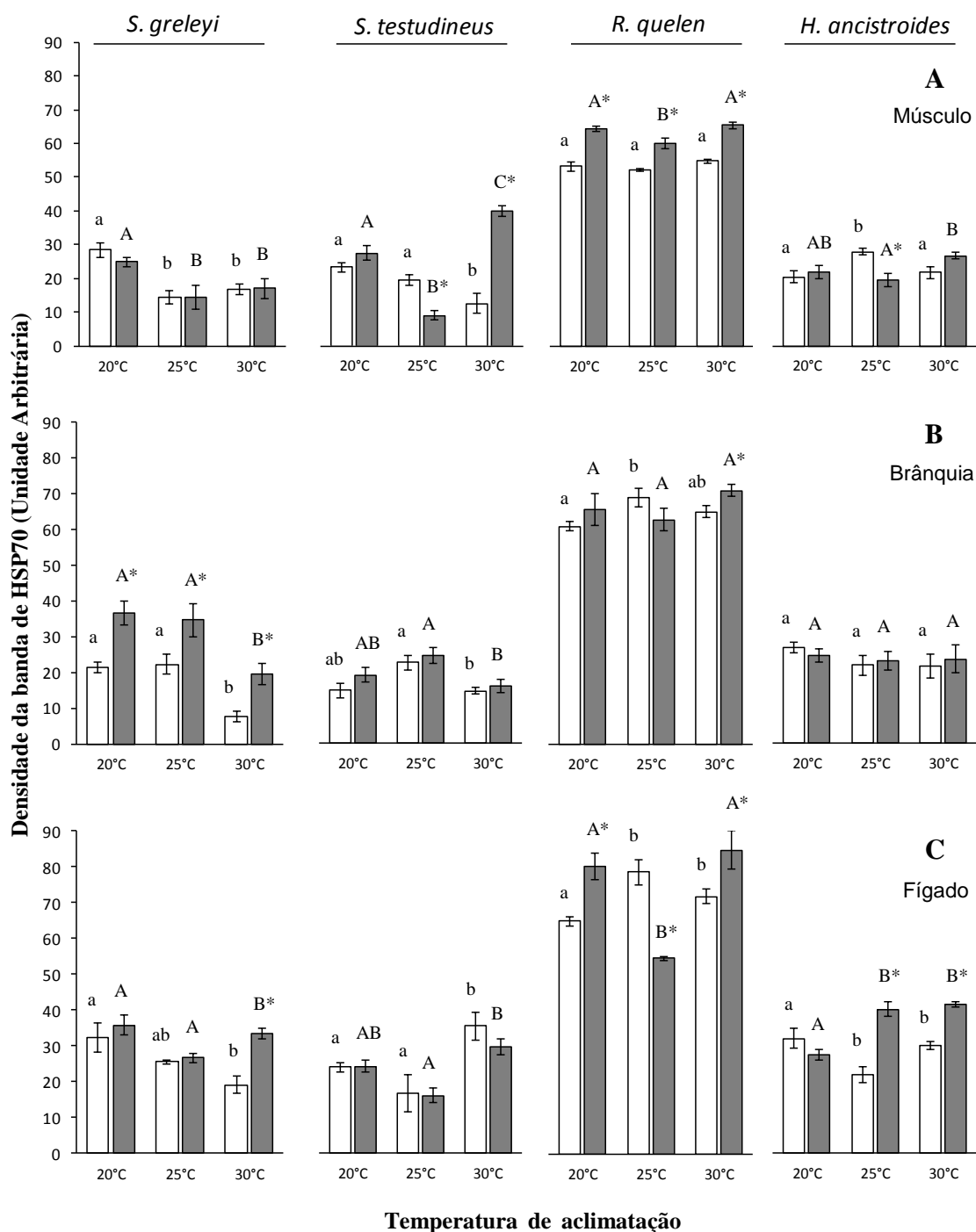


Figura 2. Expressão por western blot de HSP70 em *S. greeleyi* (n = 5 - 6), *S. testudineus* (n = 4 - 6), *R. quelen* (n = 5 - 6) e *H. ancistroides* (n = 2 - 4) aclimatados à 20°C, 25°C e 30°C por 5 dias (controle) e submetidas ao experimento de temperatura crítica máxima (CTMáx) (experimental). A: expressão no músculo; B: expressão na brânquia; C: expressão no fígado. * diferença estatística entre peixes controles e os peixes submetidos à CTMáx. Letras minúsculas indicam diferença entre as temperaturas de aclimação na condição controle e letras maiúsculas na condição experimental CTMáx. Barras. □ para controle e ■ para peixes expostos à CTMáx (p < 0,05).

DISCUSSÃO

As espécies de peixes dulcícolas *R. quelen* e *H. ancistroides* apresentaram maior resistência à elevação de temperatura dos que os baiacus marinhos/estuarinos *S. greeleyi* e *S. testudineus*. *S. greeleyi* foi a espécie que apresentou menores valores de CTMáx. As maiores temperaturas de aclimação levaram a maiores CTMáx na espécie marinha estuarina *S. testudineus*. Já *R. quelen* e *H. ancistroides* não apresentaram diferença de CTMáx entre as temperaturas de aclimação.

As espécies de peixes dulcícolas de rios (*R. quelen* e *H. ancistroides*) apresentaram maior CTMáx que os baiacus marinhos/estuarinos. As duas espécies dulcícolas em seu ambiente natural geralmente enfrentam variações de temperaturas menores e/ou mais frias que os baiacus que vivem nas águas rasas de praias e estuários. Além disso, o baiacu *S. testudineus*, que vive na parte do estuário mais próxima a desembocadura do rio, chegando a invadir corpos d'água dulcícolas (Figueiredo e Menezes 2000), apresentou maior CTMáx que *S. greeleyi*, que em geral se encontra nas águas rasas, próximos à região praiana (Figueiredo e Menezes 2000). Rios e corredeiras tendem possuir variações de temperatura mais rápidas e intensas que lagos e o oceano devido a suas características físico-químicas (Webb et al. 2008). Águas rasas de estuários e áreas praianas podem enfrentar também alterações térmicas rápidas e intensas, devido sua pouca profundidade (Lalli e Parson 1997). Essas variações diferenciadas na intensidade e velocidade de variação de temperatura da água acontecem devido à influência da radiação solar, da densidade e massa de água a ser aquecida, da cobertura vegetal e da sazonalidade do local que influenciam cada local (Lalli e Parson 1997, Wetzel 2001, Webb et al. 2008).

Em geral espécies adaptadas a ambientes mais quentes podem ter menor habilidade de aclimatar à elevação de temperatura, como aconteceu com *S. greeleyi* comparado à *S. testudineus*, e as duas espécies de baiacus em relação às dulcícolas de rios *R. quelen* e *H. ancistroides*. Essa diferença pode ser explicada por dois fatores descritos na literatura. Primeiramente essas espécies que vivem em ambientes mais quentes podem ser mais vulneráveis a elevação de temperatura devido a suas taxas metabólicas mais elevadas. A aceleração térmica do metabolismo gerada pela elevação na temperatura tem um maior efeito absoluto nas taxas de alteração metabólica nas espécies de ambientes quentes do que as adaptadas às temperaturas mais baixas com

menores taxas metabólicas (Dilon et al. 2010, Somero 2011). As espécies de águas mais quentes também podem ser mais influenciadas pelo aumento de temperatura, pois elas já viveriam em ambientes onde a temperatura aquática sofre variações naturais que se aproximam de seus limites térmicos, ou seja, já vivem em um ambiente em que as flutuações naturais de temperatura atingem níveis que excedem o ótimo da espécie, e mesmo pequenas elevações de temperatura que extrapolem essa variação natural poderiam ser letais, por ultrapassarem o limite térmico da espécie (Tomanek 2008, Sorensen et al. 2009, Tomanek 2010, Hoffmann e Sgrò 2011).

Os baiacus congêneres *S. greeleyi* e *S. testudineus* apresentaram tolerâncias térmicas diferentes, que podem explicar a diferença na distribuição das espécies no estuário. Enquanto *S. greeleyi* habita águas mais rasas próximas à área de rebentação das praias, *S. testudineus* pode ser encontrado adentrando desembocaduras de rios e áreas com aporte dulcícola (Figueiredo e Menezes 2000). Os efeitos bioquímicos e fisiológicos da temperatura desempenham um papel importante na distribuição e abundância dos organismos (Fangue et al. 2006). A comparação entre espécies filogeneticamente próximas pode fornecer uma melhor compreensão das variações adaptativas de tolerância térmica (Somero 2002). Espécies congêneres geram respostas esclarecedoras sobre a intensidade de alterações ambientais que são necessárias para favorecer mudanças adaptativas em sistemas fisiológicos, e ajudam a distinguir a plasticidade fenotípica de efeitos filogenéticos (Pfennig et al. 2010, Somero 2011). De modo geral esses congêneres apresentam baixos níveis de divergência evolucionária e ao estudar indivíduos do mesmo gênero que habitam ambientes distintos e possuem diferentes tolerâncias térmicas, é possível inferir que o ambiente pode estar influenciando as adaptações fisiológicas e fenotípicas dessas espécies ao longo do tempo (Pfennig et al. 2010), como foi o caso observado nos baiacus *S. greeleyi* e *S. testudineus*.

Em contraste, os Siluriformes *R. quelen* e *H. ancistroides*, bagres dulcícolas, não apresentaram diferenças de CTMáx comparados entre si, e nem em diferentes temperaturas de aclimação. Essa similaridade de tolerância ao aumento Crítico de temperatura pode estar ligada ao fato de ambas as espécies já apresentarem um longo tempo de evolução em ambiente térmico similar (Lundberg e Friel 2003, Nelson 2006). Uma resposta similar a essa encontrada nos bagres de água doce, pôde ser observada também para os peixes Amazônicos *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus*

(estudados nos demais capítulos da tese; ver Tab. 1) que também apresentaram resistência similar à elevação crítica de temperatura, mesmo sendo filogeneticamente distantes (*C. macropomum* Characiformes e *A. ocellatus* Perciformes). Essas espécies vivem em um ambiente de águas quentes nos rios Amazônicos e com pouca variação sazonal de temperatura (Barletta et al. 2010) e por isso suas histórias térmicas são similares, visto que evoluíram no mesmo ambiente termal. Logo, apesar de não serem filogeneticamente próximas, de diferentes famílias ou ordens, houve um padrão de resposta à elevação de temperatura nessas espécies de bagres e amazônicos dulcícolas que pode então estar ligado a suas histórias evolutivas e térmicas em ambientes similares de água doce, ou seja, as adaptações seriam ligadas ao ambiente e não à filogenia.

Analisando as espécies dentro de suas alterações pontuais de expressão de HSP70 foi possível observar que no tecido muscular *S. greeleyi* apresentou uma diminuição na expressão da proteína com o aumento da temperatura, enquanto nas brânquias ocorreu o oposto, um aumento de HSP70 seguindo o aumento da temperatura. Isso poderia explicar a baixa tolerância da espécie às variações térmicas, comparada às demais, já que altos níveis de proteínas nas brânquias podem indicar uma resposta primária ao estresse (Yang et al. 2013, Madeira et al. 2014), mas os baixos níveis no músculo demonstra em um prazo maior esse estresse pode ser suficientemente alto para que a espécie perca a capacidade de responder à essa alteração (Madeira et al. 2014). *S. testudineus* apresentou um aumento na expressão da proteína de choque térmico no músculo em animais expostos à CTMáx em 30°, o que pode indicar que a elevação térmica crítica pode ser mais impactante no animal nessa temperatura do que nas demais. Tanto no músculo quanto no fígado *R. quelen* apresentou aumento da expressão de HSP70 nos animais expostos à CTMáx em comparação aos controles, isso pode indicar que apesar da espécie já possuir altos níveis da proteína, durante elevações térmicas abruptas se faz necessária a expressão de mais proteínas para poder responder às variações de temperatura (Madeira et al. 2012).. *H. ancistroides* apresentou um aumento da expressão de HSP70 do fígado nos animais submetido a CTMáx em comparação com os controles, indicando também que possivelmente neste tecido a elevação crítica de temperatura gera uma resposta mais intensa de expressão de proteínas para lidar com o choque térmico (Madeira et al. 2014).

A espécie de bagre dulcícola *R. quelen* apresentou uma expressão de HSP70 mais elevada do que *H. ancistroides* e as duas espécies de baiacus, porém diferenças de expressão nos tecidos e aclimações. Houve uma variação interespecífica de HSP70, demonstrando a especificidade na regulação da resposta ao estresse. Esse caráter espécie-específica da expressão de HSP70 é reforçado por dados da literatura, os quais inclusive indicam que mesmo em espécies do mesmo gênero ou até intraespecificamente, pode haver uma resposta diferente quanto a expressão de HSP70, visto que esta expressão pode variar por muitos fatores que vão desde a história evolutiva e térmica da espécies, até ao tipo de ambiente e variações enfrentadas naturalmente (Iwama et al. 1999, Ford et al. 2004, Martínez-Álvarez et al. 2005, Vinagre et al. 2012, Madeira et al. 2012, Madeira et al. 2014).

A alta expressão de HSP70 em *R. quelen* quando comparada as demais espécies pode estar ligada tanto ao caráter espécie específico da proteína, quanto a características morfológicas, fisiológicas e ecológicas da espécie, de acordo com sua história térmica e sua estratégia preparativa de defesa frente à variação térmica (Hofmann 2005, Dong et al. 2008). *R. quelen* é uma espécie bastante utilizada em pisciculturas e criadouros, exatamente por ser tolerante a amplas variações ambientais (Gomes et al. 2000). O fato dos indivíduos dessa espécie terem sido obtidos de pisciculturas pode estar influenciando nos altos valores de HSP70 encontrados, pois são animais que são selecionados artificialmente para serem resistentes, e para tal já devem possuir uma maquinaria de defesa a variações de estressores como a temperatura que foi selecionada justamente para melhorar a eficácia de cultivo. Manter elevados níveis de HSP70 constantemente pode evitar gastos extras de energia com altos níveis de indução de expressão proteína frente a um estresse inesperado (Madeira et al. 2012).

Assim como em outros estudos (Madeira et al. 2012, Madeira et al. 2014) de maneira geral não foi identificada diferença entre os níveis de HSP70 dos animais controle e dos animais submetidos à CTMáx, apenas com algumas exceções (*R. quelen* no músculo, *S. greeleyi* nas brânquias e *H. ancistroides* no fígado), sugerindo que um aumento rápido de temperatura pode não induzir uma expressão adicional de HSP70 nessas espécies, ou outros fatores que não a elevação crítica de temperatura estariam ligados a expressão diferenciada da proteína (Madeira et al. 2014). De forma similar a baixa ou nula, variação da expressão de HSP70 mesmo em diferentes temperaturas de aclimação, pode sugerir que as espécies estudadas no presente trabalho já mantém um

nível basal de HSP70 suficientemente alto para responder às elevações de temperatura, ou que essas espécies já enfrentam variações frequentes de temperatura em seus ambientes naturais (em acordo com sua história térmica), e manteriam uma expressão constante de HSP70, não necessitando de uma elevação da indução frente a novas variações térmicas (Reid et al. 1998, Hofmann 2005, Dong et al. 2008, Madeira et al. 2012).

Observa-se que, em geral, os níveis de HSP70 nas quatro espécies foram variados nos diferentes tecidos. Essa expressão diferenciada sugere que a resposta ao estresse térmico é específica para cada tecido, possivelmente atuando de acordo com função biológica do tecido analisado (Dietz e Somero 1993, Rabergh et al. 2000, Madeira et al. 2014). A expressão diferenciada no fígado pode ocorrer devido à grande influência do aumento de temperatura no metabolismo dos animais, e este sendo um órgão altamente ativo, com inúmeras funções metabólicas, requer um alto nível de chaperonas para manter e proteger proteínas de danos (Yang et al. 2013, Madeira et al. 2014). Enquanto as brânquias podem responder a variações de temperatura com níveis consideráveis de HSP70, pois é o órgão que se encontra diretamente em contato com a água e por isso realiza trocas térmicas rapidamente (Yang et al. 2013, Madeira et al. 2014).

O estudo comparativo de diferentes táxons e ecossistemas possibilita a caracterização e a detecção da vulnerabilidade do ambiente frente a alterações ambientais não naturais, como o aquecimento global (Tomanek 2008, Somero 2011). Ao expor os peixes ao estresse crítico de temperatura e avaliar as alterações nas proteínas de estresse, podem ser definidos os limites térmicos das espécies e estimar o risco dos animais ao enfrentarem temperaturas que ultrapassam os limiares críticos, através da avaliação da resposta fisiológica gerada pela alteração de HSP70, sendo possível também identificar temperaturas que podem ser estressantes ou energeticamente custosas, e que afetam a sobrevivência da espécie (Tomanek 2008, Hofmann e Todgham 2010, Currie 2011, Schulte 2011).

Os dados aqui apresentados ajudam a amparar a afirmação de que espécies que vivem em ambientes instáveis, com alterações diárias e sazonais de temperatura, rápidas e intensas, como é o caso das quatro espécies estudadas, que podem ativar a respostas fisiológicas ao choque térmico através da expressão de HSP70 para enfrentar as variações de temperatura, ora mantendo uma alta expressão constitutiva da proteína, ou

aumentando a expressão quando há uma variação térmica que excede os limites ótimos (Tomanek 2008, Gaston et al. 2009, Somero 2010).

A avaliação de espécies próximas filogeneticamente e a comparação entre elas em relação a seus habitats e modos de vida pode explicar as diferenças nas tolerâncias apresentadas e a variação nos níveis de HSP70. As espécies marinhas estuarinas *S. greeleyi* e *S. testudineus* apresentaram CTMáx similares quando comparadas às dulcícolas *R. quelen* e *H. ancistroides*. Porém dentro das espécies congêneres foi possível observar uma maior tolerância térmica em *S. testudineus*, peixe que habita locais mais internos na região estuarina, com mais contato com variações não só de temperatura, mas de outros fatores abióticos, como salinidade e pH, que podem influenciar sua maior tolerância, quando comparado à *S. greeleyi*, que apresentou os menores valores de CTMáx e habita ambientes de águas rasas praianas. Já as espécies dulcícolas apresentaram CTMáx similar possivelmente devido à suas origens em ambientes termicamente parecidos, *R. quelen* de cultivos e rios lodosos, e *H. ancistroides* de corpos d'água lóticos de corredeiras, mostrando que a tolerância térmica estaria ligada à proximidade das características ambientais e não necessariamente a filogenia.

Espécies de ambientes similares demonstraram padrões equivalentes de tolerância a elevação crítica de temperatura, não havendo uma influência da proximidade filogenética nesses padrões. Mesmo sem um padrão geral na expressão de HSP70, as diferentes espécies apresentaram níveis da proteína que reforçam a importância da HSP70 na resposta ao choque térmico como mecanismo de defesa das espécies em relação às variações térmicas do ambiente aquático.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES, CNPq e Fundação Boticário pelo apoio financeiro. Também às Dras. Luciana Souza-Bastos e Nédia Ghisi e ao Msc. Leopoldo Gutierrez pelo apoio nas coletas. Trabalho aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA), do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (número 627).

REFERÊNCIAS

- Ackerman, P. A., Forsyth, R. B., Mazur, C. F. and Iwama, G. K., (2000). Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*. 23:327 -336.
- Barletta, M., Jaureguizar, A. J., Baigun, C., Fontoura, N. F., Agostinho, A. A., Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Torres, R. A., Jimenes-Segura, L. F., Giarrizzo, T., Fabré, N. N., Batista, V. S., Lasso, C., Taphorn, D. C., Costa, M. F., Chaves, P. T., Vieira, J. P., Corrêa, M. F. M. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76(9):2118-2176.
- Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., Iwama, G.K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295:173-183.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58:237–275.
- Beitinger, T., Lutterschmidt, W. (2011). *Measures of Thermal Tolerance*. Elsevier Inc. 8 pp.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Buckley, L.B., Waaser, S.A., MacLean, H.J., Fox, R. (2011) Does including physiology improve species distribution model predictions of responses to recent climate change? *Ecology* 12: 2214–2221.
- Buckley, B. A., Owen, M.-E., Hofmann, G. E. (2001). Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *Journal of Experimental Biology* 204:3571-3579.
- Cara, J.B., Aluru, N., Moyano, F.J., Vijayan, M.M. (2005). Food-deprivation induces Hsp70 and HSP90 protein expression in fry gilthead sea bream and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 142:426–431.

- Casatti, L. (2002). Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 2(2)
- Chippari-Gomes, A.R. (1998). Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824 – Pisces, Pimelodidae). Santa Maria – RS. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 70 p.
- Cooke, S.J., Sack L., Franklin, C.E., Farrell, A.P., Beardall, J., Wikelski, M., Chown, S.L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology* 1.
- Currie, R. J., Bennett ,W. A., Beitinger, T. L. (1998). Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 51:187–200.
- Currie, S. (2011). Heat Shock Proteins and Temperature. In: Farrel, A. P. (ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego: Academic Press. Pp. 1688-1694.
- Currie, S., Tufts, B.L. (1997). Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells, *Journal of Experimental Biology* 200:607–614.
- Currie, S., Moyes, C.D., Tufts, B.L. (2000). The effects of heat shock and acclimation temperature on heat shock protein70 and heat shock protein30 mRNA expression in rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons, *Journal of Fish Biology*. 56:398–408.
- Deane, .E., Kelly, S., Luk, J., Woo, N. (2002) Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream. *Marine Biotechnology* 4:193–205.
- Dietz, T.J., Somero, G.N. (1993). Species- and tissue-specific synthesis patterns for heat shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes. *Physiological Zoology* 66: 863–880.
- Dillon, M. E., Wang, G. and Huey, R. B. (2010). Global metabolic impacts of recente climate warming. *Nature* 467:704-706.

- Donaldson, M.R., Cooke, S.J., Patterson, D.A., MacDonald, J.S. (2008). Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology* 73:1491–1530.
- Dong, Y., Miller, L.P., Sanders, J.G., Somero, G.N. (2008). Heat-shock protein 70 (Hsp70) expression in four limpets of the genus *Lottia*: interspecific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. *Biological Bulletin*. 215:173–181.
- Dyer, S.D., Dickson, K.L., Zimmerman, E.G. and Sanders, B.M. (1991). Tissue specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Zoology* 69: 2021–2027.
- Efremova, S.M., Margulis, B.A., Guzhova, I.V., Itskovich, V.B., Lauenroth, S., Muller, W.E.G. and Schroder, H.C. (2002). Heat shock protein hsp70 expression and DNA damage in baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from baikalsk pulp and paper plant. *Aquatic Toxicology* 57: 267–280
- Fangue, N. A., Hofmeister, M., Schulte, P. (2006). Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, 209:2859–2872.
- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A. (2000). Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). Sao Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de Sao Paulo, 116p.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79:425-449.
- Ford, J.M.J., Tibbetts, I.R., Carseldine, L. (2004). Ventilation rate and behavioural responses of two species of intertidal goby (Pisces: Gobiidae) at extremes of environmental temperature. *Hydrobiologia* 528:63–73.
- Fordyce, J.A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology* 209: 2377–2383.
- Franklin, C.E., Seebacher, F. (2012) Conservation physiology: integrating physiological mechanisms with ecology and evolution to predict responses of organisms to environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 367: 1605–1779.

- Gaston, K.J., Chown, S.L., Calosi, P., Bernardo, J., Bilton, D.T., Clarke, A., Clusella-Trullas, S., Ghalambor, C.K., Konarzewski, M., Peck, L.S., Porter, W.P., Pörtner, H.O., Rezende, E.L., Schulte, P.M., Spicer, J.I., Stillman, J.H., Terblanche, J.S., van Kleunen, M. (2009). Macrophysiology: a conceptual reunification. *American Naturalist* 174: 595–612.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B. (2000). Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30(1):179-185
- Gutierre, S. M. M., Vitule, J. R. S., Freire, C. A., and Prodocimo, V. (2014). Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Marine and Freshwater Research* 65, 425-436.
- Hoffmann, A.A., Sgrò, C.M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470:479–485
- Hofmann, G. E. (2005). Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology* 45:247-255.
- Hutchison, V. E (1976). Factors influencing thermal tolerance of individual organisms. In: Esch, G. W and McFarlane R. W. (eds) *Thermal Ecology II*. U.S. National Technical Information Service, Springfield. pp. 10-26.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M, Forsyth, R.B., Ackerman, P.A. (1999). Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoologist* 39:901-909.
- Iwama, J. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207:15-19.
- Jiménez-Valverde, A., Lobo, J. M. (2011). Tolerance limits, animal. In: Simberloff, D., Rejmanek, M. (eds) *Encyclopedia of biological invasions*. University of California Press, CA, pp 661–663
- Jonsson, H., Schiedek, D. and Goksøyr, A. (2006) Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants, *Aquatic Toxicology* 78:42–S48.

- Knoppers, B., Machado, E. C., Brandini, N., Landim-de Souza, W. F. (2004). Sediment oxygen and nutrient fluxes in three estuarine systems of south-eastern Brazil. In: Drude de Lacerda, L., Santelli, R.E., Duursma, E.K., Abrao, J.J. (Eds.) Environmental geochemistry in tropical and subtropical environments. Series: Environmental Science and Engineering. XX, 385 p.
- Kregel, K. C. (2002). Invited Review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92:2177–2186.
- Lalli, C.M., Parsons, T. R. (1997). *Biological Oceanography: An Introduction*. 2 edn., Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford, UK.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Edusp, São Paulo.
- Lund, S.G., Lund, M.E.A. and Tufts, B.L. (2003). Red blood cells Hsp70 mRNA and protein as bioindicators of temperature stress in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fisheries and Aquatic Sciences* 60:460–470
- Lundberg, J. G., Friel, J. P. (2003). Siluriformes. Catfishes. Available at: <http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20>. Acessado em: 10/01/2015
- Madeira D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Costa, P. M., Diniz, M. S., Vinagre, C. (2014). Physiological and biochemical thermal stress response of the intertidal rock goby *Gobius paganellus*. *Ecological Indicators* 46:232-239.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 70:32–41.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15:75–88.
- Mora, C., Maya, M. F. (2006). Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology* 31:337-341.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world*. 4th edn. John Wiley and Sons, New York.

- Ojima, N., Yamashita, M., Watabe, S. (2005). Comparative expression analysis of two paralogous Hsp70s in rainbow trout cells exposed to heat stress, *Biochimica et Biophysica Acta* 1681: 99–106.
- Ospina, A.F., Mora, C. (2004). Effect of body size on reef fish tolerance to extreme low and high temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 70:339-343.
- Pfennig D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., Moczek, A.P. (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecology and Evolution* 25:459-67.
- Place, S. P., Hofmann, G .E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in a phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biology* 28:261-267.
- Portner, H.O, Farrell, A.P. (2008). Physiology and climate change. *Science* 322:690–692.
- Rabergh, C.M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Bjorklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M., Sistonen, L., 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *Journal of Experimental Biology* 203:1817–1824.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 120:1–27.
- Roberts, R., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases* 33:789–801
- Roberts, D. A., Hofmann, G. E. and Somero, G. N. (1997). Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *Biological Bulletin*. 192, 309-320
- Schulte, P.M. (2011). Effects of Temperature: An Introduction. In: Farrell, A. P. (ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press, San Diego, CA. Pp. 1688-1694.

- Somero, G.N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 42:780–789 .
- Somero, G. N. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 139:321-333
- Somero, G. N. (2005). Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in Zoology* 2:1-9.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology* 213:912–920.
- Somero, G. N. (2011). Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 30(1):R1–R14.
- Sørensen, J. G., Pekkonen, M., Lindgren, B., Loeschcke, V., Laurila, A., Merilä, J. (2009). Complex patterns of geographic variation in heat tolerance and Hsp70 expression levels in the common frog *Rana temporaria*. *Journal of Thermal Biology*, 34:49–54.
- Spicer, J.I., Gaston, K.J. (1999). *Physiological Diversity and its Ecological Implications*. Blackwell Science, Oxford.
- Tomanek, L. and Somero, G. N. (1999). Evolutionary and acclimation induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *Journal of Experimental Biology*. 202, 2925-2936.
- Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:709–717.
- Tomanek, L. (2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology* 213:971-979.
- Villwock, F. H., Crispim, J. De Q., Rocha, J. A. da (2013). Levantamentos De Parâmetros Limnológicos Na Bacia Hidrográfica Do Rio Do Campo – Pr. In: *Anais*

- do VIII Encontro de Produção Científica e tecnológica. Disponível em: http://www.fecilcam.br/nupem/anais_viii_epct/PDF/TRABALHOS-COMPLETO/AnaisCET/GEOGRAFIA/fhvillwooktrabalhocompleto.pdf. Acessado dia 23/11/2014.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. S. (2012). Impact of climate change on coastal versus estuarine nursery areas: cellular and whole-animal indicators in juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. Marine Ecology Progress Series, 464:237–243.
- Wang, J., Wei, Y., Li, X., Cao, H., Xu, M., Dai, J. (2007). The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China, Comparative Biochemistry and Physiology Part C 145:350-362.
- Webb, B. W., Hannah, D. M., Moore, R. D., Brown, L. E., Nobilis, F. (2008). Recent advances in river and stream temperature. Hydrological Processes 22:912-918.
- Wetzel, RG. (2001). Limnology: lake and river ecosystems. San Diego: Elsevier Academic Press. 1006 p
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005). Environmental physiology of animals. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.
- Wood C. M., Wilson, R. W., Gonzalez, R. J., Patrick, M. L., Bergman, H., Narahara, A., Val, A. L. (1998). Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH in extremely soft water. Physiological Zoology 71:658–670.
- Yang, Y., Ye, H., Huang, H., Li, S., Liu, X., Zeng, X., Gong, J. (2013). Expression of Hsp70 in the mud crab *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. Cell Stress Chaperones 18, 475–482.

**CAPÍTULO 2 - TOLERÂNCIA TÉRMICA E EXPRESSÃO DE
HSP70 DO PEIXE AMAZÔNICO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*)**

SUMÁRIO

Capítulo 2 - tolerância térmica e expressão de hsp70 do peixe Amazônico Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	48
SUMÁRIO.....	49
RESUMO	50
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
Atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase	56
Expressão das proteínas por Western Blotting (HSP70)	56
Expressão do RNA-HSP70 através de Real-time PCR	58
Análise Estatística	59
RESULTADOS	59
Temperatura Crítica Máxima (CTMáx)	59
Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase	59
Expressão de HSP70 por Western Blotting	60
qPCR.....	62
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

O Tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes), conhecido por seu alto valor comercial, habita rios da bacia Amazônica com temperaturas de aproximadamente 25°C a 32°C e baixa concentração de íons. A determinação da tolerância térmica da espécie e a expressão de HSP70 são importantes para prever os limites de sobrevivência a variações de temperatura ambiental, bem como a ativação de mecanismos de proteção celular contra o estresse térmico. Os Tambaquis foram submetidos a temperaturas de aclimação de 25°C, 30°C e 35°C por cinco dias. Após esse período foi determinada a temperatura Crítica Máxima (CTMáx) e a Temperatura Letal (CTLetal), a atividade das enzimas Na⁺K⁺-ATPase e H⁺-ATPase branquial; e a expressão de HSP70 nos tecidos muscular, branquial e hepático. Os indivíduos aclimatados à 25°C, 30°C e 35°C apresentaram CTMáx de 40,9°C, 41,9°C e 42,2°C respectivamente. CTLeta foi de 43°C para os animais aclimatados a 25°C e 30°C, e 43,5°C para os aclimatados a 35°C. A atividade Na⁺K⁺-ATPase branquial permaneceu inalterada nos diferentes grupos experimentais e a atividade da H⁺-ATPase aumentou nos animais aclimatados a 35°C e submetidos à CTMáx, quando comparados aos animais em 25°C e 30°C. A expressão de HSP70 diminuiu com o aumento da temperatura no tecido muscular, aumentou no tecido branquial e permaneceu inalterada no fígado. Em relação ao mRNA HSP70, não ocorreram alterações de expressão nas diferentes temperaturas de aclimação e também não houve mudança frente à exposição a CTMáx. A tolerância de *C. macropomum* à elevação de temperatura corrobora com a alta resistência térmica máxima de animais de regiões tropicais. O aumento da H⁺-ATPase na temperatura de 35°C representa um efeito indireto da elevação da temperatura na fisiologia da espécie. A expressão de HSP70 sugere a presença de mecanismos de proteção celular que auxiliam na sobrevivência dessa espécie às temperaturas quentes e reforça a importância da proteína na tolerância ao estresse térmico. O Tambaqui demonstrou-se bastante tolerante à aclimação em diferentes temperaturas e às elevações de temperatura, ativando mecanismos fisiológicos de forma específica e responder ao estresse térmico.

Palavras-chave: Peixe Amazônico, Temperatura Crítica, HSP

INTRODUÇÃO

Os corpos aquáticos da bacia Amazônica abrigam uma das maiores diversidades de peixe do planeta. Os rios e afluentes que formam a bacia apresentam características físico-químicas diversas em relação a regime de água, turbidez, acidez, temperaturas elevadas e aporte de matéria orgânica. Essas características dinâmicas do ambiente propiciaram o desenvolvimento de várias estratégias adaptativas em peixes, relacionadas à fisiologia, ecologia e biologia dos animais (Val et al. 2006, Amtyaz et al. 2013).

Em um cenário de mudanças climáticas, onde há projeções de um aumento de temperatura na região Amazônica de 2 – 3°C (General Circulation Models, GCM's) e uma diminuição da precipitação em meses de seca (Mitchell et al. 1995, Kattenberg et al. 1996), o aquecimento dos corpos d'água da bacia Amazônica poderá impactar diretamente espécies vulneráveis às variações térmicas. Essas mudanças na temperatura da água podem afetar a distribuição das espécies de peixes e aumentar o risco de invasões biológicas (Latini e Petrere Jr 2004, Rahel e Olden 2008), além de reduzir os níveis de oxigênio dissolvido da água alterando a ecologia do local (Carpenter et al. 1992, Portner e Peck 2010). Para enfrentar essas mudanças climáticas, os peixes precisam dispor de mecanismos fisiológicos que auxiliem na manutenção da homeostase e na adaptação ao novo regime térmico (Portner 2002, Tomanek 2008). Para tanto, conhecer os limites de tolerância térmicos das espécies pode auxiliar no estudo de impacto e na predição de sobrevivência em locais afetados por alterações térmicas.

O Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Characidae, Cuvier 1818) é um peixe nativo da região da bacia Amazônica, conhecido por seu alto valor comercial, principalmente pelo uso na alimentação (Val e Honckzaryk 1995, Araújo-Lima e Goulding 1998). É uma espécie bastante adaptável a cultivos e pisciculturas em viveiros e tanques-rede (Araújo-Lima e Gomes 2010). No seu ambiente natural (rios Amazônicos), essa espécie ocorre em águas com temperaturas que variam anualmente de 25°C a 32°C (Barletta et al. 2010), pH ácido (Rio Negro com pH em torno de 5,5), baixas concentrações iônicas (níveis de Na⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ geralmente menores que 50 mmol L⁻¹) (Val e Almeida-Val 1995, Walker e Henderson 1996). Os níveis de oxigênio são baixos, com condições recorrentes de anoxia e hipóxia (chegando a < 2 mg l⁻¹ O₂),

as quais são determinadas pela composição da cobertura vegetal do corpo d'água, pela profundidade do local e pelo período do dia (Furch 1984, Furch e Junk 1997, Almeida-Val et al. 1999, Barletta et al. 2010).

Os processos fisiológicos auxiliam na determinação dos limites de tolerância a fatores abióticos como a temperatura, e contribuem para previsão e compreensão dos impactos gerados por alterações no ambiente (Portner 2002, Tomanek 2008, Tomanek 2010). A temperatura da água é decisiva na fisiologia dos animais aquáticos. Elevações na temperatura geralmente potencializam as atividades metabólicas e as reações enzimáticas ficam mais rápidas, tornando o crescimento e reprodução, por exemplo, mais eficazes. Porém há um limite térmico a partir do qual as reações bioquímicas, como o funcionamento de enzimas e ativação de proteínas diminui drasticamente, e os efeitos da temperatura podem ser letais para o organismo, causando desnaturação das proteínas (Portner 2002, Willmer et al. 2005, Somero 2011, Madeira et al. 2012a).

A determinação da temperatura crítica do animal fornece dados ecológicos e fisiológicos relevantes para identificar seus limites de tolerância quando ocorrem variações térmicas, em função de mudanças temporais ou flutuações agudas da temperatura ambiental (Brett 1956, Hutchison 1976, Currie et al. 1998, Beitinger et al. 2000, Carveth et al. 2006). A determinação da temperatura crítica máxima (CTMáx) é um parâmetro utilizado em estudos macrofisiológicos que visam compreender e comparar a variação fisiológica dos organismos ao longo de gradientes geográficos (Cowles e Bogert 1944, Lutterschmidt e Hutchison 1997, Carveth et al. 2006, Rezende et al. 2014, Vinagre et al. 2015) e também para fazer inferências aos diferentes limites de tolerância térmica das espécies, como de peixes teleósteos (Somero 2010, Beitinger e Lutterschmidt 2011, Rezende et al. 2014). Em Prodocimo e Freire (2001) é possível observar uma compilação de valores de CTMáx para 18 espécies de peixes em diferentes temperaturas de aclimação, comprovando a amplitude do método como importante parâmetro para determinação e respostas de peixes às variações de temperaturas.

Mecanismos de regulação osmo-iônica (osmorregulação) do meio interno também podem ser influenciados por alterações da temperatura do ambiente (Willmer et al. 2005, Evans e Claiborne 2009). Proteínas localizadas em células branquiais ricas em mitocôndrias dos peixes, responsáveis pela absorção de sal em água doce como a H^+ -ATPase e a Na^+/K^+ -ATPase, podem responder de forma indireta a choques térmicos,

através do aumento ou redução de suas atividades frente à elevação da temperatura (Metz et al. 2003, Freire e Prodocimo 2007). A H^+ -ATPase (ou $V-H^+$ -ATPase) é uma enzima que além de atuar no mecanismo de regulação ácido-base, nas brânquias de peixes de água doce é responsável também pela absorção de sal. A secreção ativa de íons H^+ , gera gradiente eletroquímico que favorece a absorção de Na^+ da água por canais, e o Cl^- entra na célula via trocador Cl^-/HCO_3^- (revisado em Evans et al. 2005, Marshall e Grosell 2005, Evans e Claiborne 2009). Em ambientes de águas ácidas, como as águas do Rio Negro Amazônico onde são encontrados os Tambaquis, o pH reduzido pode reduzir o gradiente responsável pelo influxo de Na^+ e inibe a captação de Cl^- diminuindo seus níveis plasmáticos (Wood et al. 1998, Kwong et al. 2014). Outra enzima fundamental para manutenção da homeostase osmo-iônica é a Na^+/K^+ -ATPase (ou NaK). Localizada na membrana basolateral das células ricas em mitocôndrias, a Na^+/K^+ -ATPase transporta íons Na^+ para o extracelular e K^+ para o intracelular, gerando assim um gradiente eletroquímico que auxilia a H^+ -ATPase na absorção de sal pelo epitélio branquial (Evans et al. 2005, Marshall e Grosell 2005, Freire et al. 2008). Alterações na temperatura da água podem influenciar a fluidez da membrana celular, através de alterações na composição lipídica, além de afetar a termo estabilidade e a atividade da enzima (Hazel e Prosser, 1974, Fields 2001, Metz et al. 2003). A elevação de temperatura aumentou a atividade Na^+/K^+ -ATPase em brânquias de goldfish (*Carassius auratus*) (Hazel e Prosser 1974, Murphy e Houston 1974), porém existem poucos outros trabalhos que exemplificam essa influência da temperatura nessas proteínas osmorregulatórias.

A nível celular, a temperatura alterada também pode resultar na expressão da classe de proteínas altamente conservadas conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP) (Fink 1999, Dahlhoff 2004, Hofmann 2005, Evgen'ev et al. 2014). Esta é a proteína de estresse mais comumente induzida em resposta a condições fisiológicas sub-ótimas, sendo induzidas por diversos tipos de estresse (Feder e Hofmann 1999, Iwama *et al.* 2004, Hoffman 2005, Evgen'ev et al. 2014). As HSPs são uma família de chaperonas envolvidas no dobramento e união de proteínas nativas, além de impedir a desnaturação ou agregação das proteínas em situações de estresse (Fink 1999, Dahlhoff 2004, Place e Hofmann 2005, Hofmann 2005). Sob condições de estresse, as HSPs migram até o núcleo da célula onde elas agem para reparar e proteger as proteínas nucleares e minimizar a agregação de proteínas prevenindo danos (Bensaude et al. 1990,

Feder e Hofmann 1999, Evgen'ev et al. 2014). O aumento no nível dessas proteínas protege a célula de estresses subsequentes que, de outra forma, poderiam ser letais (Hightower 1999, Hofmann 2005, Kayhan e Duman 2010).

A síntese de mRNA HSP pode indiciar a resposta inicial da célula ao estresse. Durante estresse térmico o mRNA HSP pode ser induzido em questão de minutos (Lis e Wu, 1994), isso porque a maioria dos genes de HSP não possuem íntrons (partes não codificantes do DNA), então o mRNA é rapidamente traduzido quando há exposição a determinado estresse (Iwana et al. 2004). A síntese de mRNA pode ser uma forma mais rápida e sensível de detectar a resposta celular ao estresse quando comparada a síntese da proteína (Currie et al. 2000).

O estudo das respostas fisiológicas ao estresse através de HSPs é uma ferramenta bastante útil para quantificar os níveis de estresse dos organismos, podendo assim compreender os tipos de alterações ambientais que limitam a distribuição dos organismos (Sorensen et al. 2003, Tomanek 2008, Hofmann e Todgham 2010). O emprego de ferramentas fisiológicas, como a determinação da expressão de HSP70, é bastante relevante na compreensão dos limites térmicos, da distribuição, e das respostas ao estresse dos organismos, quando seu ambiente é variável, pode sofrer alterações antrópicas ou alterações abióticas drásticas (Iwama et al. 2004, Hofmann e Todgham 2010, Tomanek 2010).

O objetivo desse estudo foi determinar os limites térmicos máximos do caracídeo amazônico *C. macropomum*, e avaliar a expressão da proteína de estresse térmico HSP70 e a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase diante de um choque térmico. Por ser uma espécie amazônica de regiões quentes, espera-se que a temperatura crítica máxima apresente valores altos, acompanhada de expressão elevada da HSP70 como mecanismo de proteção celular ao choque térmico, e também existam níveis diferenciados das enzimas devido ao efeito do aumento da temperatura na modulação da atividade enzimática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os indivíduos de *Colossoma macropomum* foram adquiridos em uma estação de piscicultura localizada próximo a cidade de Manaus, estado do Amazonas, e transportados até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM –

INPA). Os peixes, pesando em torno de $9,3 \pm 0,5$ gramas, foram aclimatados em laboratório por um mês em tanques de 1000 litros com água decolorada, a temperatura de 28–30°C, aeração constante e fotoperíodo de 12L:12D. Os peixes eram alimentados três vezes por semana com ração comercial (Nutripiscis, Presence – 36% de proteína) e a água dos tanques era trocada parcialmente uma vez por semana.



Figura 1. Espécies *Colossoma macropomum*. Fonte: Google Images.

Após à aclimação de um mês em laboratório, foram realizados testes de tolerância à variação de temperatura. Os animais foram dispostos em caixas plásticas 1,5 litros individuais e submetidos a três temperaturas de aclimação por cinco dias: 25°C, 30°C e 35°C. Alguns peixes foram mantidos nas temperaturas de aclimação para controle, os demais ($n=10$ para cada temperatura de aclimação) foram submetidos aos testes de temperatura crítica máxima (CTMáx = média das temperaturas na qual cada indivíduo alcançou seu ponto Crítico) de acordo com Prodócimo e Freire (2001). Experimentos de CTMáx baseiam-se em um aumento linear constante na temperatura aquática até que seja atingido o limiar de sobrevivência do animal. Esse limiar é atingido quando o animal se encontra em uma situação pré-letal, que significa para peixes a perda de equilíbrio, colapso sensorial e desorientação. A temperatura crítica letal (CTLetal) é determinada quando o peixe cessa os movimentos operculares, quando ocorre total perda de resposta e, conseqüentemente, inevitável morte (Beitinger et al. 2000, Beitinger e Lutterschmidt 2011). O aumento da temperatura foi de 2°C/hora até atingir a CTMáx e a CTLetal (CTLetal = 100% mortalidade) (Baseado em Beitinger et al. 2000).

Após os experimentos os animais foram anestesiados em benzocaína (80mg/L) e amostras de músculos, fígado e brânquias foram retirados e congelados em freezer - 80°C para posterior análise da expressão da proteína por western blot e do RNAm das

HSP70, e os arcos braquiais do lado esquerdo foram coletados para posterior análise da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase.

Atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase

Para determinação da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foi utilizado o protocolo estabelecido por Kültz e Somero (1995) e modificado por Duarte et al. (2013). O ensaio se baseia na reação de redução do NADH pela reação enzimática acoplada ao mecanismo de hidrólise do ATP. Uma fração de tecido branquial (1 parte de tecido em 10 de tampão) de *C. macropomum* foi homogeneizada em tampão SEID (Sacarose 150mM, Imidazol 50mM, EDTA 10mM, ácido deoxicólico 0,5%, pH 7,5). O homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 xg a 4°C e retirado o sobrenadante. O total de 5µl do sobrenadante foi adicionado, juntamente com 200 µl de solução de reação (Imidazol 30mM, NaCl 45mM, KCl 15mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3mM, KCN 0,4mM, 1.0mM de ATP, 0,2mM de NADH, 3IU/ml de PK, 2IU/ml de LDH, 0,1mM de Frutose-1,6-Difosfato e 2mM de PEP), a cada poço de uma única linha da microplaca (12 poços), totalizando um total de 8 amostras por placa. As amostras foram divididas em quadruplicatas, sendo nas 4 primeiras réplicas adicionado somente a solução de reação sem inibidores. Nas outras 4 foi adicionada solução de reação contendo 2mM de ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase) e nas 4 últimas réplicas foi adicionada a solução contendo 2mM de N-etil-etanolamina (inibidor da H^+ -ATPase). A leitura foi realizada em absorbância de 370 nm (Tecan Infinite M200, Áustria) a temperatura ambiente. A inclinação da reta de regressão linear obtida pela taxa de oxidação do NADH pelo tempo foi usada para determinação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase. A unidade obtida para ambas as enzimas foi de mmol ATP h⁻¹mg proteína⁻¹. Para determinação das proteínas totais no sobrenadante do tecido branquial e renal foi utilizado método estabelecido por Bradford (1976).

$$\text{Atividade} = \{(\text{inclinação} \times 56,6) / ([\text{Proteínas}] \times 0,005) \times 60 / 1000\} \times -1$$

Expressão das proteínas por Western Blotting (HSP70)

Amostras de músculos obtidos nos experimentos foram homogeneizados durante 5 minutos, com tampão de homogeneização (HEPES 20mM, NaCl 15mM, Triton X-100 1%, NP-40 1%) e inibidores de protease (Benzamidina 20mM, EDTA 10mM, Iodocetamida 10mM, Pepstatina 5µg/mL, 1,10 Fenantrolina 5mM, PMSF 2mM), utilizando o homogeneizador Tecnal TE-103. Após a homogeneização o material foi

centrifugado a 12000xg por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi congelado a -80°C. A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi dosada utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976), com leitura em microplacas no leitor de Elisa a 595nm. A detecção da expressão das proteínas foi feita a partir do ensaio imunológico por Western Blotting.

As proteínas extraídas dos fragmentos de músculos dos animais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com protocolo baseado em Gutierrez et al. (2014). Uma alíquota do extrato de proteínas (contendo 200 mg de proteína total) foi diluída em tampão de amostra, e submetida a um gel de corrida (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150mM contendo SDS 1mM (pH 8,8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50mM contendo SDS 1mM (pH 6,8). A corrida, na qual se utiliza tampão Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS, ocorreu por aproximadamente 4 horas com corrente constante de 20 mAmp. Imediatamente após a corrida, os peptídeos do gel foram transferidos para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blot contendo tampão de transferência formado de Tris-Base, Glicina, SDS 10% e Metanol 20%. A transferência foi realizada em corrente de 120 mA e 25 mV, durante aproximadamente 16 horas. A faixa com o marcador de peso molecular foi cortada, e o restante da membrana contendo as proteínas foi incubado com tampão TBST contendo leite em pó com baixo teor de gordura, por 60 minutos para bloqueio de sítios não específicos. Após, o material foi incubado por duas horas na presença dos anticorpos primários (diluídos 1:1000 em TBST + leite em pó 5% ~ 5mL), anti-HSP70 (marca BD). Em seguida foi lavado cinco vezes, por cinco minutos, com tampão TBST e incubado com o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina, diluído 1:1000 em TBST + leite em pó 5% ~ 5mL) por duas horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por cinco minutos e em seguida o material foi coberto com cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP/NBT (~5mL), permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas de marcação das proteínas. Após o aparecimento das bandas, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água destilada para parar a reação.

A membrana com as bandas foi digitalizada e a expressão das proteínas será quantificada através da análise da intensidade relativa de cinza das bandas, utilizando o programa Image J.

Expressão do RNA-HSP70 através de Real-time PCR

→ Extração de RNA Total e transcrição reversa

O RNA total do músculo de tambaqui foi extraído por meio do protocolo TRIZOL® Reagent (Invitrogen). A integridade do material genético foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). A concentração e a pureza das amostras foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific) por meio da razão dos valores de absorbância nos comprimentos de onda 260/280 nm e 260/230 nm. A fita de cDNA foi sintetizada por transcrição reversa utilizando 1 µg de RNA total em 20 µL de volume final da reação, utilizou-se o kit Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante.

→ Expressão gênica – PCR em Tempo Real (RT-PCR)

Para verificar os padrões de expressão gênica em indivíduos de *Colossoma macropomum* submetidos a variações de temperatura, um experimento de PCR em Tempo Real foi realizado. Nesse experimento quatro indivíduos de cada condição experimental e dos controles foram analisados em triplicata. Primers específicos da proteína de choque térmico (Hsp70) (Hsp70 F: 5' – AGAGAGAGAAGGTCACAGCC - 3'); (Hsp70 R: 5' – TGTCTTCTTGTC ATCAGC - 3') e de 28S (28S F: 5' - AAAGGGTGTCTGGGTTTCAGAT); (28S R: 5' - CGGGTTCGTTTGCGT TAC – 3') foram desenhados utilizando o software Oligo Explorer 1.2. Para determinar a eficiência de cada primer utilizado, curvas padrão foram geradas utilizando 10 pontos de diluição seriada (1/2) a partir de uma única amostra de cDNA constituída de um pool de três cDNAs do experimento. A quantificação de RT-PCR foi realizada no equipamento ViiA 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems), cada reação foi realizada em triplicata para um volume final de 10 µL contendo 5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de cada primer (2,5 µM). As condições dos ensaios incluem uma desnaturação inicial de dois minutos a 50 °C e 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60 °C por 60 s e um estágio para curva de hibridização (Melt Curve) a 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s e 95 °C por 15 s para confirmação da especificidade dos amplicons. A eficiência da PCR (E) foi calculada pela obtenção dos valores de slope da curva padrão de acordo com a equação $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$. Para o gene hsp70 (slope: 3.299; R2: 0.996; E: 100.3 %) e 28S (slope: 3.33; R2: 0.998; E: 99.39 %). Os resultados de expressão gênica relativa aqui apresentados

foram normalizados pelo gene de referência 28S RNA, utilizando o método de $2-(\Delta\Delta Ct)$ descrito por Pfaall (2001).

Análise Estatística

Os dados de CTMáx foram analisados através de teste t comparando as diferentes temperaturas de aclimação (25°C x 30°C, 25°C x 35°C, 30°C x 35°C). A expressão do RNAm e níveis de HSP70 detectados por Western Blot, e a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foram analisados através de Two-Way ANOVA, comparando as condições controle e experimental (animais aclimatados à 25°C, 30°C e 35°C por 5 dias x animais submetidos ao experimento de CTMáx) e as temperaturas de aclimação dentro da mesma condição (diferenças das aclimações 25°C x 30°C x 35°C em animais controles e para os animais submetidos CTMáx) com teste de post hoc de Holm-Sidak (SigmaPlot versão 11.0). Nível de significância utilizado foi de 0,05.

RESULTADOS

Temperatura Crítica Máxima (CTMáx)

Colossoma macropomum aclimatados por 5 dias a 25°C e submetidos ao experimento de elevação crítica de temperatura a CTMáx foi de $40,9 \pm 0,6$ e a CTLetal foi de 43°C. Nos aclimatados à 30°C a CTMáx foi de $41,9 \pm 0,3$ e a CTLetal foi também de 43°C. E nos animais aclimatados a 35°C a CTMáx foi de $42,2 \pm 0,4$ e a CTLetal foi de 43,5°C. Não houve diferença na CTMáx do animais aclimatados a 25°C quando comparados ao animais em 30°C, e do animais aclimatados a 30°C em comparação aos aclimatados a 35°C ($P > 0,05$). Porém a CTMáx do animais aclimatados a 35°C foi maior do que nos animais a 25°C ($P < 0,05$).

Atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase foi reduzida para os peixes submetidos a aclimação de 30°C quando comparados aos animais aclimatados a 25°C. Não houve diferença de atividade da enzima entre os animais dos grupos expostos ao experimento de CTMáx em nenhuma das temperaturas de aclimação. Na temperatura de aclimação de 25°C houve uma maior atividade da Na^+/K^+ -ATPase nos animais controles em relação aos submetidos à CTMáx (Fig. 2A).

A enzima H^+ -ATPase aumentou sua atividade nos peixes controles e submetidos à CTMáx aclimatados a 35°C quando comparados aos animais em 25°C e 30°C. Não

houve diferença nos níveis da proteína entre os animais controles comparados aos animais expostos à CTMáx dentro de cada temperatura de aclimação ($p < 0,05$) (Fig. 2B).

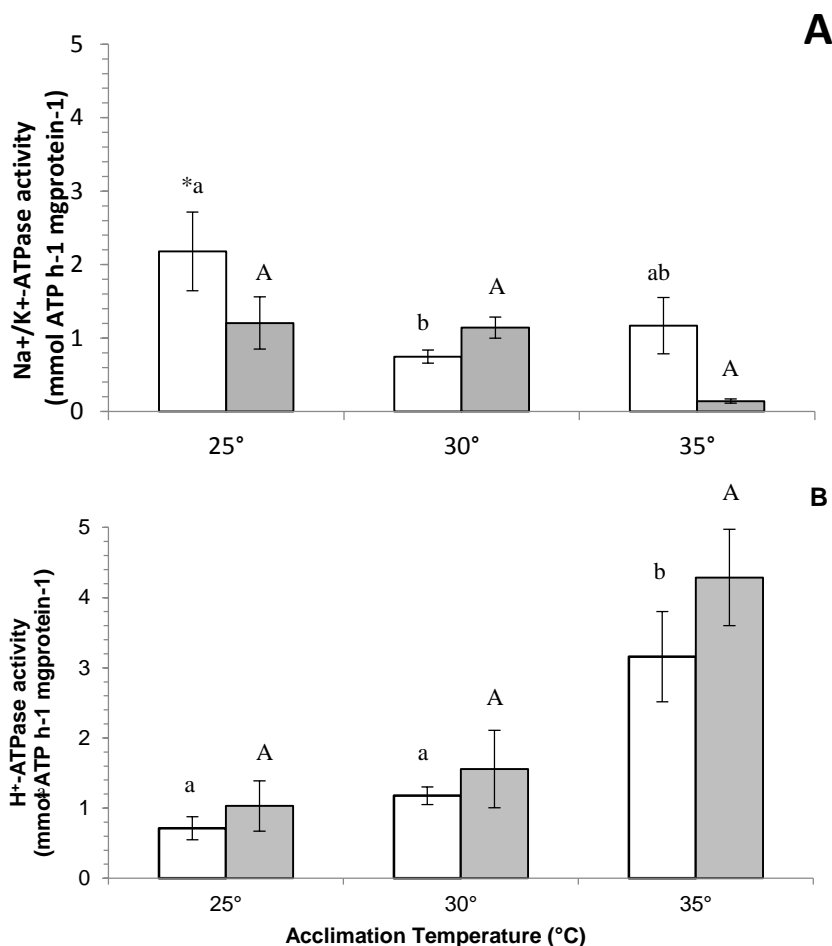


Figura 2. Atividade das enzimas (A) Na⁺/K⁺-ATPase (n=4) e (B) H⁺-ATPase (n=4) de indivíduos de *C. macropomum* controles aclimatado a 25, 30 e 35°C (barras brancas) e submetidos ao teste de CTMáx (barras preenchidas). * diferença estatística entre peixes controles e os peixes submetidos à CTMáx. Letras minúsculas indicam diferença entre as temperaturas de aclimação na condição controle e letras maiúsculas na condição experimental CTMáx ($p < 0,05$).

Expressão de HSP70 por Western Blotting

A expressão de HSP70 no tecido muscular foi mais elevada na temperatura de aclimação de 25°C em relação à expressão nos animais aclimatados a 30°C e 35°C. Dentro da aclimação de 25°C houve aumento da expressão de HSP70 dos animais submetidos a CTMáx em relação aos controles. Houve diminuição dos níveis de HSP70 dos animais submetidos a CTMáx aclimatados às temperaturas de 30°C e 35°C quando comparados aos aclimatados a 25°C (Fig. 3A).

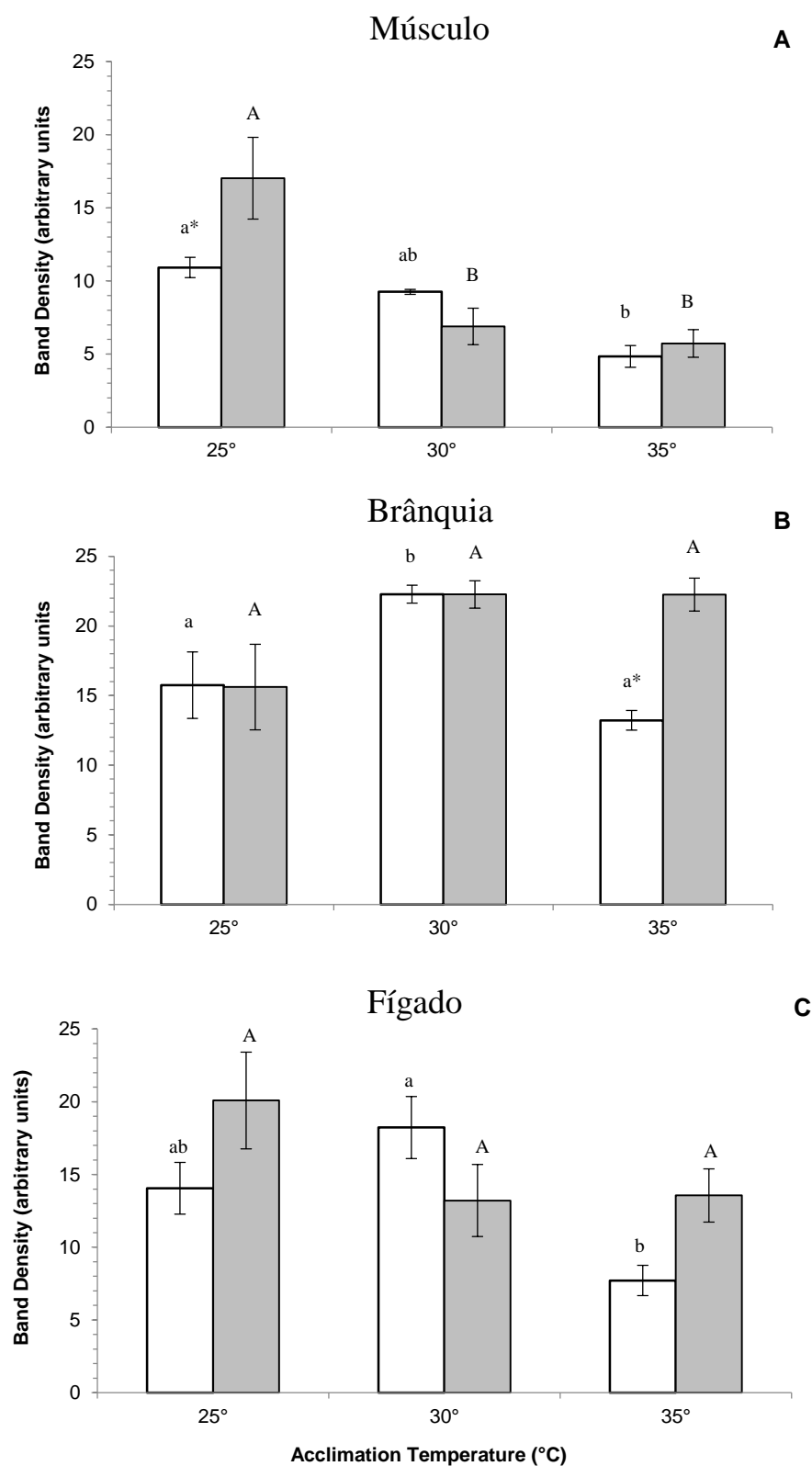


Figura 3. Expressão de HSP70 em *C. macropomum* (n= 6). Controles aclimatados à 25°C, 30°C e 35°C por 5 dias (barras brancas) e expostos ao experimento de CTMáx (barras preenchidas). (A) músculo, (B) brânquia e (C) fígado. * diferença estatística entre peixes controles e os peixes submetidos à CTMáx. Letras minúsculas indicam diferença entre as temperaturas de aclimação na condição controle e letras maiúsculas na condição experimental CTMáx ($p < 0,05$).

Nas brânquias houve um aumento da expressão de HSP70 em animais controle aclimatados a 30°C em comparação com os controles aclimatados a 25°C e 35°C. Nos peixes submetidos ao teste de CTMáx houve aumentos dos níveis de HSP70 nos animais das aclimações de 30°C e 35°C comparados aos de 25°C. Apenas na temperatura de aclimação de 35°C houve aumento da expressão de HSP70 dos animais submetidos ao teste de CTMáx em comparação com seus controles (Fig. 3B).

No fígado houve diminuição dos níveis de HSP70 nos animais controle aclimatados a 35°C em comparação aos controles aclimatados à 30°C. Não houve diferença de expressão de HSP70 no fígado entre os animais submetidos ao teste de CTMáx para nenhuma das temperaturas de aclimação, assim como não houve alteração da expressão de HSP70 nos animais submetidos a CTMáx nas diferentes temperaturas de aclimação (Fig. 3C).

qPCR

A expressão de mRNA HSP70 apresentou diferença entre animais controles e os expostos à CTMáx apenas na aclimatados a 25°C, onde os controles apresentaram maior expressão que os animais expostos à CTMáx ($P < 0,05$). Os níveis de expressão de mRNA HSP70 não se alteraram em numa das demais condições. As médias de expressão nos controles foram de $1,04 \pm 0,57$ (25°C), $0,43 \pm 0,14$ (30°C) e $0,61 \pm 0,14$ (35°C). Para os animais expostos à CTMáx as médias foram $0,23 \pm 0,04$ (25°C), $0,12 \pm 0,02$ (30°C) e $0,30 \pm 0,11$ (35°C) (Fig. 4).

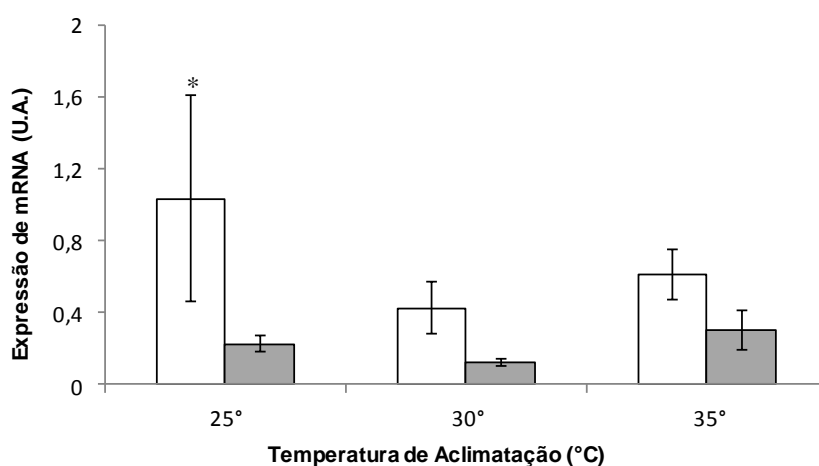


Figure 4. Expressão de mRNA HSP70 muscular de *C. macropomum* (n= 5-6) em peixes controles aclimatados à 25°C, 30°C e 35°C por 5 dias (barras brancas) e expostos ao experimento de CTMáx (barras preenchidas). * diferença estatística entre peixes controles e os peixes submetidos à CTMáx ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A espécie *C. macropomum* apresentou uma alta resistência à elevação de temperatura, atingindo CTMáx de aproximadamente 42°C e CTLetal de 43,5°C. Esses valores elevados são comumente esperados para peixes de regiões tropicais, que vivem em um ambiente de águas quentes (Prodocimo e Freire 2001). A história evolutiva da espécie é fundamental para determinar os limites de tolerância térmica (Currie 2011, Galbraith et al. 2012). Em geral espécies de peixes de regiões tropicais frequentemente possuem CTMáx que ultrapassam 40°C, pois são animais que vivem em regiões de água mais quentes, habituados a temperaturas altas em seus ambientes naturais, e portanto são mais resistentes a aumentos na temperatura da água quando comparados a peixes de regiões de águas mais geladas (Prodocimo e Freire 2001). Por exemplo, populações do peixe tropical *Poecilia reticulata*, que vivem em lagos e rios da Venezuela, apresentam CTMáx de 39-40°C e CTLetal de 41.2-42.8°C quando aclimatados à 24°C, 30°C e 33°C (Chung 2001). Outra espécie tropical *Xiphophorus maculatus* nativo de regiões do México e Guatemala apresentou CTMáx de 40,4°C quando aclimatados à 25°C e 41,5°C quando aclimatados à 30°C (Prodocimo e Freire 2001). As CTMáx de *C. macropomum* variando de 40,9°C à 42,2°C se aproxima a altas CTMáx encontradas para peixes tropicais e reforça a alta tolerância desses peixes endêmicos de regiões quentes à elevação de temperatura.

Além da história evolutiva, os limites críticos de temperatura podem ser influenciados pela temperatura de aclimação. Geralmente a aclimação em temperaturas mais quentes geram um aumento na temperatura crítica máxima (Beintiger et al. 2000, Dülger et al. 2012), o que corrobora com o resultado encontrado para o Tambaqui, onde houve aumento de cerca de 0,6°C na CTMáx em cada temperatura de aclimação, com uma taxa de aproximadamente 0,15°C de aumento de tolerância para cada 1°C a mais de aclimação. Resultados similares foram encontrados para as espécies de regiões temperadas *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis* que apresentaram taxas de aumento de tolerância térmica em relação à temperatura de aclimação de 0,14 °C (Fry et al. 1946, Currie et al. 1998) e também para *Oncorhynchus keta* com taxa de 0,12 °C (Brett 1952).

Apesar de diversos trabalhos utilizarem taxas de elevação de temperatura variáveis (Mora e Maya 2006), a taxa de aproximadamente 1-2°C/hora demonstra ser

uma taxa em que muitas espécies atingem seu limite de tolerância máximo. Muitos peixes aclimatados a altas temperaturas podem alcançar sua taxa de aclimação a diferentes temperaturas em questões de poucas horas (Segnini et al. 1993, Chung 2001, Lutterschmidt e Hutchison 1997, Mora e Maya 2006), o que demonstra que uma taxa de variação poucos graus por hora (1-2°C) pode ser suficiente para que haja aclimação total do peixe na temperatura atingida (Mora e Maya 2006). O Tambaqui submetido a alterações de temperatura nessa faixa respondeu de forma satisfatória, atingindo temperaturas críticas altas, de acordo com o esperado para a espécie tropical. Em geral as águas da região Amazônica possuem uma temperatura anual média de 30°C, variando de 25 a 32 °C (Barletta et al. 2010), porém em alguns cultivos, poças ou pequenos lagos formados pelos regimes de chuvas intermitentes, as temperaturas enfrentadas por *C. macropomum* podem ser mais elevadas.

Muitos estudos sugerem que animais euritérmicos ectotérmicos de regiões tropicais, como o Tambaqui, já vivem em locais onde a temperatura aquática oscila perto limites de tolerância térmicos máximos, muitas vezes até vivendo em locais que apresentam temperaturas maiores do que as consideradas ótimas para o desenvolvimento normal do animal. Estas espécies seriam drasticamente afetados pelas alterações climáticas globais, pois pequenas alterações na temperatura da água seriam determinantes para a extrapolação de sua tolerância térmica, pois em geral já vivem próximos a seus limites de tolerância (Sorensen et al. 2009, Tewksbury et al. 2008, Somero 2010, Tomanek 2010, Hoffmann e Sgrò 2011). De acordo com os resultados de CTMáx e CTLetal apresentados pelo Tambaqui elevações de 4-5°C na temperatura da água em seu ambiente poderiam comprometer suas funções fisiológicas e elevações à partir de 40°C poderiam ser letais para a essa espécie.

Altas temperaturas podem afetar a composição lipídica celular, levando a alterações na fluidez da membrana e alterar o balanço entre as trocas celulares, perturbando as condições intracelulares, o que por consequência, influencia na atividade de enzimas como a Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase (Fields 2001, Metz et al. 2003, Willmer et al. 2005). A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial de *C. macropomum* pouco se alterou nas diferentes temperaturas de aclimação e quando os animais foram expostos ao teste de temperatura crítica indicando nesse caso, que as alterações térmicas não foram suficientes para modificar a atividade da proteína, ou que outros tipos de

respostas podem estar envolvidas na compensação do estresse térmico que não a alteração na Na^+/K^+ -ATPase (Houston e Mearow 1982, Kultz e Somero 1995).

Os mecanismos de ativação da H^+ -ATPase frente ao estresse térmico ainda são pouco discutidos na literatura. Em *Gillichthys mirabilis*, espécie tolerante a elevação de temperatura, não foram observadas alterações na atividade tanto de H^+ -ATPase quanto de Na^+/K^+ -ATPase quando aclimatados em 7°C ou em 26°C, e os autores sugerem que essa falta de alteração pode ser devido à características espécie-específicas das enzimas (Kultz e Somero 1995). Houve um aumento na atividade de H^+ -ATPase branquial dos Tambaquis aclimatados a 35°C e expostos ao teste de CTMáx, quando comparado aos aclimatados a 25°C e 30°C. A H^+ -ATPase é responsável por gerar gradiente eletroquímico que favorece a absorção de Na^+ em água doce, e para manutenção do equilíbrio ácido-base através das trocas de H^+ (Hwang 2009). Em maiores temperaturas ocorre situação de hipóxia na água aumentando o CO_2 . Esse CO_2 em reação com a H_2O dissocia-se em H^+ e HCO_3^- , que gera um aumento dos níveis de H^+ , que tende a sair do organismo (Claiborne et al. 2002, Perry e Gilmour 2006), e um consequente aumento da atividade da H^+ -ATPase. Esse aumento da atividade da H^+ -ATPase é esperado em ambientes onde há necessidade de maior secreção de H^+ pelo organismo (Duarte et al. 2013), o que poderia explicar a elevação da atividade da H^+ -ATPase seguindo o aumento de temperatura observada nos resultados do Tambaqui. As mudanças relacionadas a atividade da enzima também podem estar ligadas aos efeitos na fluidez da membrana, compensação iônica ou alterações energéticas relacionadas ao estresse térmico (Kultz e Somero 1995, Fields 2001, Metz et al. 2003), porém a maioria das explicações sugere que as alterações em ambas as enzimas são resultados de efeitos indiretos da elevação de temperatura, causados por alterações bioquímicas ou energéticas que desencadeariam as respostas das proteínas/enzimas (Fields 2001, Metz et al. 2003).

Em *C. macropomum* observou-se que independente da temperatura de aclimação os níveis de mRNA HSP70 muscular se mantiveram inalterados, mesmo após a elevação de temperatura na CTMáx. Alguns estudos reportaram o aumento nos níveis de mRNA HSP70 para peixes expostos a altas temperaturas (Fangue et al. 2006, Jesus et al. 2013), porém a não alteração ou diminuição na expressão de mRNA HSP70 também já foi reportado para peixes teleósteos (Jesus et al. 2013). Essa inabilidade de aumentar os níveis de expressão de mRNA HSP70 pode estar ligada tanto a falta de

capacidade de se adaptar a diferentes temperaturas, visto que a espécie muitas vezes pode não enfrentar tais temperaturas em ambientes naturais, quanto ao contrário, a espécie já está adaptada a esse tipo de variação e por isso não precisa alterar seus níveis basais de expressão, já que esse nível pode ser suficiente para responder ao estresse (Logan e Somero 2010, Jesus et al. 2013). A histórica térmica dos animais deve ser levada em consideração quando se utilizam metodologias de análise de HSP mRNA a fim de entender a respostas a esse estresse e detectar como a plasticidade do animal tem relação com a expressão de mRNA HSP (Currie et al. 2000, Hofmann 2005).

O gene responsável pela ativação da mRNA HSP70, o hsc70, é um gene que faz parte das funções constitutivas da célula, e aumentos na temperatura podem não afetar a expressão do gene, visto que a expressão constitutiva pode ser suficientemente alta, ou o organismo pode já estar apresentando níveis relativos a seu limite, sem possuir a capacidade para uma super expressão (Yeh e Hsu 2002, Yamashita et al. 2004, López-Maury et al. 2008). A maioria dos dados existente sobre a elevação do mRNA HSP70 frente a elevações de temperatura concentram-se em espécies de climas temperados, o Tambaqui, sendo uma espécie tropical, pode não ter aumentado sua expressão do mRNA porque os níveis constitutivos de proteína expressa já são altos o suficiente para responder às altas temperaturas, ou já estavam em seu limite de expressão (Iwama et al. 2004, Logan e Somero 2010, Jesus et al. 2013).

Na expressão de HSP70 por western blotting foram encontradas diferenças na expressão nas brânquias, onde houve aumento da proteína com o aumento da temperatura de aclimação, enquanto no músculo e no fígado os níveis diminuíram ou permaneceram inalterados. Estudo anteriores já demonstraram diferença nos níveis de HSP70 em diferentes tecidos e órgãos de teleósteos submetidos a estresse térmico (Dietz e Somero 1993, Currie et al. 2000, Madeira et al. 2014) sugerindo que a resposta ao estresse térmico é diferentemente ativada em cada tecido, sendo mais requeridas em alguns tecidos e órgãos, como brânquias e fígado, do que em outros como músculo e cérebro (Dietz e Somero 1993, Madeira et al. 2014), possivelmente pela natureza da função de cada tecido ou órgãos. As brânquias por ser o órgão que está em contato direto com a água e sofre trocas térmicas rapidamente quando há alterações na temperatura aquática, pode ser primariamente afetado e responder de forma a aumentar seus níveis de HSP70 com maior intensidade (Yang et al. 2013, Madeira et al. 2014).

Pode-se observar que houve diminuição nos níveis da proteína detectados por Western Blot no músculo do peixe com o aumento da temperatura de aclimação. Nas brânquias houve aumento dos níveis de HSP70 com o elevação da temperatura de aclimação, enquanto no fígado os níveis permaneceram em geral inalterados. Além disso, houve apenas diferenças pontuais entre animais aclimatados e os animais expostos a elevação crítica de temperatura. Madeira et al. (2013) também observaram que não houve alteração dos níveis de HSP70 com o aumento crítico da temperatura em músculos das espécies *Diplodus vulgaris* e *Dicentrarchus labrax*, que condizem com os de *C. macropomum*. Outros estudos relacionando CTMáx e HSP70 também demonstraram que não houve alteração nos níveis de proteínas em diferentes tecidos e condições experimentais para organismos aquáticos (Botton et al. 2006, Madeira et al. 2012b, Madeira et al. 2014). Tais resultados sugerem que os níveis de HSP70 é espécie específico e variável mesmo intra-especificamente (Ford et al. 2004, Vinagre et al. 2012, Madeira et al. 2012b, Madeira et al. 2014), por isso torna-se difícil a determinação de padrões nos níveis da proteína.

Diferentes temperaturas de aclimação podem afetar a síntese de HSPs em peixes (Dietz e Somero 1992, Dietz 1994, Buckley e Hofmann 2004, Lund et al. 2006). Em geral existem respostas a estresse temporárias, que não exigem a síntese de novas HSPs, na qual os níveis basais já são suficientes para responder ao distúrbio, e uma resposta de longo prazo, ou muito intensa, que requer a síntese de mais proteínas de choque térmico (Currie 2011). A temperatura na qual é necessária a ativação da síntese de HSP e as quantidades requeridas da proteína frente ao estressor de fato parece ser espécie específica (Tomanek e Somero, 1999, Madeira et al. 2012b).

Outros artigos ainda sugerem que ao se analisar a história térmica do organismo (Hofmann 2005), é possível que quando o estressor, no caso alta temperatura, é encontrado com frequência no ambiente natural do animal, pode haver uma menor indução na resposta de HSP70 a ele (Reid et al. 1998), ou que o organismo já mantenha seus níveis de HPS70 altos para evitar o gasto extra de energia para enfrentar variações na temperatura naturais, a chamada “estratégia de defesa preparativa” (Dong et al. 2008, Madeira et al. 2012b), o que pode ser observado no Tambaqui, principalmente no tecido branquial e hepático.

Por ser uma espécie economicamente muito valorizada e por viver em um ambiente de alto valor biológico, *C. macropomum* é um peixe que desperta interesse de

mais estudos para compreensão da sua ecofisiologia. No presente trabalho os limites térmicos críticos do animal frente de elevação de temperatura foram determinados, e a provou-se sua grande tolerância a águas aquecidas, pois a espécie suportou temperaturas críticas máximas de aproximadamente 42°C. Também foi possível comprovar que diferentes temperaturas de aclimação podem gerar diferentes tolerâncias à elevação de temperatura e que essas elevações possuem influência na fisiologia do animal através da alteração nos níveis de proteínas de estresse. A expressão de mRNA HSP70 e quantificação dos níveis da proteína de choque térmico, demonstrou que o animal possui a maquinaria de ativação dessas chaperonas e que seus níveis basais de HSP70 parecem ser suficientes para proteger as células dos efeitos das elevações de temperatura, aumentado os níveis da proteína apenas no músculo de animais aclimatados a 25°C e brânquias de animais aclimatados a 35°C. Houve pouca alteração na atividade da proteína Na⁺/K⁺-ATPase, não sendo observado um padrão, na atividade dessa enzima porém houve um aumento na H⁺-ATPase com o aumento de temperatura, mostrando que efeitos indiretos de alterações de temperatura podem influenciar em diferentes proteínas não só ligadas ao choque térmico, mas também nas demais funções fisiológicas do animal como a regulação osmótica e iônica.

O Tambaqui provou-se tolerante a elevação crítica de temperatura, como esperado para peixes tropicais, demonstrou que possui níveis de HSP70 basais elevados, porém com pouca variação frente ao estresse térmico, e que suas demais enzimas que não atuam diretamente na resposta ao estresse térmico podem responder de forma indireta a elevação de temperatura a fim de compensar efeitos sistêmicos referente a essa elevação.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro. Ao INPA e ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, por fornecer a estrutura e material necessário para desenvolvimento dos experimentos e aos alunos do LEEM pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos. À mestranda Nayara Castro e o bolsista Ramon Batista pelas análises de qPCR.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Walker, I. (1999). Long and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂ -levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: Val, A.L. and Almeida-Val, V. M. F. (Eds.). *Biology of Tropical Fishes*. Manaus: INPA. pp. 185-206.
- Amtyaz, S., Baptista, R. B., Almeida-Val, V. M. F. (2013). The effects of increased temperature and CO₂ on the Amazon fish, tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, (1818). *International Journal of Biological Research*, 1:41-47.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., Gomes, L. de C. (2010). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L. de C. (Eds.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2da Ed. Santa Maria: UFSM, p.175-204.
- Barletta, M., Jaureguizar, A. J., Baigun, C., Fontoura, N. F., Agostinho, A. A., Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Torres, R. A., Jimenes-Segura, L. F., Giarrizzo, T., Fabré, N. N., Batista, V. S., Lasso, C., Taphorn, D. C., Costa, M. F., Chaves, P. T., Vieira, J. P., Corrêa, M. F. M. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76(9):2118-2176.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58:237–275.
- Beitinger, T., Lutterschmidt, W. (2011). *Measures of Thermal Tolerance*. Elsevier Inc. 8 pp.
- Bensaude, O., Pinto, M., Dubois, M. F., Van Trung, N. and Morange, M. (1990). Protein denaturation during heat shock and related stress. In: M.J. Schlesinger, M.G. Santoro and E. Garaci (Eds) *Stress Proteins: Induction and Function*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 89–99.
- Botton, M. L., Pogorzelska, M., Smoral, L., Shehata, A., Hamilton, M. G. (2006). Thermal biology of horseshoe crab embryos and larvae: a role for heat shock proteins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336:65–73.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.

- Brett, J. R. (1952). Temperature tolerance in young Pacific salmon, genus *Oncorhynchus*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 9:265-322.
- Brett, J. R. (1956). Some principles in the thermal requirements of fishes. The Quarterly Review of Biology, 31:75–88
- Buckley, B. A., Hofmann, G.E. (2004). Magnitude and Duration of Thermal Stress Determine Kinetics of hsp Gene Regulation in the Goby *Gillichthys mirabilis*. Physiological and Biochemical Zoology, 77(4):570–581.
- Carpenter, S. R. Fisher, S. G., Grimm, N. B., Kitchell, J. F. (1992). Global change and freshwater ecosystems. Annual Reviews Ecology and Systematics, 23:119-139.
- Carveth, C. J., Widmer, A. M., Bonar, S.A. (2006). Comparison of upper thermal tolerances for native and nonnative fish species in Arizona. Transactions of the American Fisheries Society, 135:1433–1440.
- Chung, K. S. (2001). Critical thermal maxima and acclimation rate of the tropical guppy *Poecilia reticulata*. Hydrobiologia, 462:253–257.
- Claiborne, J. B., Edwards, S. L., Morrison-Shetlar, A. I. (2002). Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. Journal of Experimental Zoology, 293:302–319.
- Cowles R. B., Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. Bulletin of the American Museum of Natural History, 83:265–296.
- Currie, R. J., Bennett, W. A., Beitinger, T. L. (1998). Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures. Environmental Biology of Fishes, 51:187–200.
- Currie, S. (2011). Heat Shock Proteins and Temperature. In: Farrel, A. P. (ed.) Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. San Diego: Academic Press. Pp. 1688-1694.
- Currie, S., Moyes, C. D., Tufts, B. L. (2000). The effects of heat shock and acclimation temperature on Hsp70 and Hsp30 mRNA expression in trout: in vivo and in vitro comparisons. Journal of Fish Biology, 56:398–408.
- Dahlhoff, E. P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. Annual Review of Physiology, 66: 183-207.
- Dietz, T. J. (1994). Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. Journal of Experimental Biology 188:333–338.

- Dietz, T. J., Somero, G. N. (1992). The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89:3389–3393.
- Dietz, T. J., Somero, G. N. (1993). Species- and tissue-specific synthesis patterns for heatshock proteins HSP 70 and HSP 90 in several marine teleost fishes. *Physiological Zoology*. 66:863–880.
- Dong, Y., Miller, L. P., Sanders, J. G., Somero, G. N. (2008). Heat-shock protein70 (Hsp70) expression in four limpets of the genus *Lottia*: inter specific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. *The Biological Bulletin*, 215:173–181.
- Duarte, R. M., Ferreira, M. S., Wood, C. M., Val, A. L. (2013). Effect of low pH exposure on Na⁺ regulation in two cichlid fish species of the Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 166:441-448.
- Dülger, N., Kumlu, M., Türkmen, S., Ölçülü, A., Eroldoğan, O., Asuman, H., Öçal, N. (2012). Thermal tolerance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles acclimated to three temperature levels. *Journal of Thermal Biology*, 37:79-82.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85:97-177.
- Marshall, W. S., Grosell, M. (2005). Ion transport, osmoregulation and acid–base balance. In: D. Evans and J. B. Claiborne (Eds.) *The Physiology of Fishes*, 3rd edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Evans, D. H., Claiborne, J. B. (2009). Osmotic and ionic regulation in fishes. In: D.H. Evans (ed.) *Osmotic and ionic regulation: cells and animals*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 295–366.
- Evgen'ev, M. B., Garbuz, D. G., Zatsepina, O. G. (2014). *Heat Shock Proteins and Whole Body Adaptation to Extreme Environments*. Dordrecht Springer Netherlands. 218 p.
- Fangue, N. A., Hofmeister, M., Schulte, P. (2006). Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, 209:2859–2872.

- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61:243-282.
- Fields, P. A. (2001). Review: protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 129:417-431.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79:425-449.
- Ford, J. M. J., Tibbetts, I. R., Carseldine, L. (2004). Ventilation rate and behavioral responses of two species of intertidal goby (Pisces: Gobiidae) at extremes of environmental temperature. *Hydrobiologia*, 528:63–73.
- Freire C. A., Onken H., McNamara J. C. (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 151:272–304
- Freire, C. A, Prodocimo, V. (2007). Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. In: Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.) *Fish Osmoregulation*. Vol. 1. Science Publishers, Enfield, pp. 249–276.
- Fry, F. E. J., Hart, J. S. and Walker, K. F. (1946). Lethal temperature relations for a sample of young speckled trout, *Salvelinus fontinalis*. *Publications of the Ontario Fisheries Research Laboratory* 66:1-35.
- Furch, K. (1984). Water chemistry of the Amazon basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: H. Sioli (ed.) *The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and Its Basin*. Dordrecht. Pp. 167–199.
- Furch, K., Junk, W. J. (1997). Physico-chemical conditions in floodplains lakes,. In: W.J. Junk. (ed.). *The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. 1 edn. Berlin: Springer Verlag. pp. 69-108.
- Galbraith, H. S., Blakeslee, C. J., Lellis, W. A. (2012). Recent thermal history influences thermal tolerance in freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Freshwater Science*, 31: 83-92.
- Gutierre, S. M. M., Vitule, J. R. S., Freire, C. A., Prodocimo, V. (2014). Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Marine and Freshwater Research* 65(5):425-436

- Hazel, J. R., Prosser, C. L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological Reviews*, 54:620-668.
- Hightower, L. E., Norris, C. E., DiIorio, P. J., Fielding, E. (1999). Heat shock response of closely related species of tropical and desert fish, *American Zoologist*, 39:877–888.
- Hofmann, G. E. (2005). Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, 45:247-255.
- Hofmann, G. E., Todgham, A. E. (2010). Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual Review of Physiology*, 72:127-145.
- Hoffmann A. A, Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470:479–485.
- Houston, A. H., Mearow, K. M. (1982). Branchial and renal (Na⁺/K⁺) ATPase and carbonic anhydrase activities in a eurythermal freshwater teleost, *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 71:175-180.
- Hutchison, V. E (1976). Factors influencing thermal tolerance of individual organisms. In: Esch, G. W and McFarlane R. W. (eds) *Thermal Ecology II*. U.S. National Technical Information Service, Springfield. pp. 10-26.
- Hwang, P. P. (2009). Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology*, 212:1745-1752.
- Iwama, J. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207:15-19.
- Jesus T. F., Inácio A., Coelho M. M. (2013). Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. *Genetics and Molecular Biology*, 36:61-69,
- Kattenberg, A., Giorgi, F., Grassl, H., Meehl, G. A., Mitchell, J. F. B., Stouffer, R. J., Tokioka, T., Weaver, A.J., Wigley, T. M. L. (1996). Climate models--projections of future climate. In: Houghton, J.T., L.G. Meira Filho, B.A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg, and K. Maskell (eds.) *Climate Change 1995: The Science of Climate Change*. Contribution of Working Group I to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. pp. 285-357.

- Kayhan, F. E., Duman, B. S. (2010). Heat shock protein genes in fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(2):287–293.
- Kültz, D., Somero, G. N. (1995). Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*, 198:1883–1894.
- Kwong, R. W. M., Kumai, Y., Perry, S. F. (2014). The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system. *Journal of Experimental Biology*, 217:651–662.
- Latini, A., Petrere Jr., M. (2004). Reduction of a native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 11:71–79.
- Lis, J.T., Wu, C. (1994). Transcriptional regulation of heat shock genes. In: R.C. Conaway and J.W. Conaway (eds.) *Transcription: mechanisms and regulation*. Raven Press, New York. pp. 459–475.
- Logan, C. A., Somero, G. N. (2010). Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). *American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 299(4):R1132.
- López-Maury L, Marguerat, S., Bähler, J. (2008). Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics* 9:583–593
- Lund, S. G., Caissie, D., Cunjak, R. A., Vijayan, M. M., Tufts, B. L. (2002). The effects of environmental heat stress on heat shock mRNA and protein expression in Miramichi strain Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59:1553–1562.
- Lund, S.G., Ruberté, M.R., Hofmann, G.E., (2006). Turning up the heat: the effects of thermal acclimation on the kinetics of hsp70 gene expression in the eurythermal goby, *Gillichthys mirabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 143:435–446.
- Lutterschmidt, W. I., Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75:1561–1574.
- Madeira D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Costa, P. M., Diniz, M. S., Vinagre, C. (2014). Physiological and biochemical thermal stress response of the intertidal rock goby *Gobius paganellus*. *Ecological Indicators*, 46:232–239.

- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N, Vinagre, C., Diniz, M. S. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 166(2):237-243 Published: 2013
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C. (2012a). Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. *Journal of Sea Research*, 70:32–41.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C. (2012b). HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *Journal of Sea Research*, 73:137–147.
- Metz, J. R., Van Den Burg, E. H., Bonga, S. E. and Flik, G. (2003). Regulation of branchial Na^+/K^+ -ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 206:2273-2280.
- Mitchell, J. F. B., Johns, T. C., Gregory, J. M., Tett, S. F. B. (1995). Climate response to increasing greenhouse gases and sulphate aerosols. *Nature*, 376: 501-504.
- Mora, C., Maya, M. F. (2006). Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology* 31:337-341.
- Murphy, P. G. F., Houston, A. H. (1974). Environmental temperature and the body fluid system of the freshwater teleost. V. -Plasma electrolyte levels and branchial microsomal (Na^+/K^+) ATPase activity in thermally-acclimated goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 47:563-570.
- Perry, S. F., Gilmour, K. M. (2006). Acid–base balance and CO_2 excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 154:199-215.
- Place, S. P., Hofmann, G .E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in a phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biology*, 28:261-267.
- Portner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 132:739-761.
- Portner, H. O., Peck, M. A. (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 77:1745-1779.
- Prodócimo, V., Freire, C. A. (2001). Critical thermal maxima and minima of the platyfish *Xiphophorus maculatus* Günther (Poeciliidae, Cyprinodontiformes) - a

- tropical species of ornamental freshwater fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18:97-106.
- Rahel, F. J., J. D. Olden (2008). Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species. *Conservation Biology* 22:521-533.
- Reid, S.G., Bernier, N. J., Perry, S.F. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 120:1–27.
- Rezende, E. L., Castañeda, L. E., Santos, M. (2014). Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology*, 28:799–809.
- Segnini, B. M., Chung, K. S., Ciurcina, P. (1993). Tasa de aclimatacion de temperatura de *Mugil curema*. *Revista de Biología Tropical*, 41:59–62.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology*, 213:912–920.
- Somero G. N. (2011). Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 30(1):R1–R14.
- Sorensen, J. G., Kristensen, T. N., Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6:1025-1037.
- Sorensen, J. G., Pekkonen, M., Lindgren, B., Loeschcke, V., Laurila, A., Merilä, J. (2009). Complex patterns of geographic variation in heat tolerance and Hsp70 expression levels in the common frog *Rana temporaria*. *Journal of Thermal Biology*, 34:49–54.
- Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Deutsch, C. A. (2008). Putting the heat on tropical animals. *Science*, 320:1296–1297.
- Tomanek, L., Somero, G. N. (1999). Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *Journal of Experimental Biology*, 202:2925–2936.
- Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81:709–717.

- Tomanek, L. (2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, 213:971-979.
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. (1995). *Fishes of the Amazon and their environments: physiological and biochemical features*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F., Randall, D. J. (2006). Tropical environment. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. e Randall, D.J. (eds) *The physiology of tropical fishes*. Elsevier, London. Vol. 21. pp. 1-45.
- Val, A., Honczaryk, A. (1995). A Criação de peixes na Amazônia: Um futuro promissor In: *Criando Peixes na Amazônia*. Ed. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. AM. pp. 1-5.
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Flores, A. A. V. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of Thermal Biology*, 47:19–25.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. S.(2012). Impact of climate change on coastal versus estuarine nursery areas: cellular and whole-animal indicators in juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Marine Ecology Progress Series*, 464:237–243.
- Walker, I., Henderson, P. A. (1996). Ecophysiological aspects of Amazonian blackwater litterbank fish communities. In: A. L. Val, V. M. Almeida-Val and D. J. Randall (eds.) *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. pp. 7-21.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005). *Environmental physiology of animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.
- Wood, C. M., Wilson, R. W., Gonzalez, R. J., Patrick, M. L., Bergman, H., Narahara, A., Val, A. L. (1998). Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH in extremely soft water. *Physiological Zoology*, 71:658–670.
- Yamashita M., Hirayoshi, K., Nagata, K. (2004). Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: Molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* 336:207-218.
- Yang, Y., Ye, H., Huang, H., Li, S., Liu, X., Zeng, X., Gong, J. (2013). Expression of Hsp70 in the mud crab *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. *Cell Stress Chaperones*, 18:475–482.

Yeh, F.L., Hsu, T. (2002) Differential regulation of spontaneous and heat-induced HSP 70 expression in developing zebrafish (*Danio rerio*). J Exp Zool 293:349-359

**CAPÍTULO 3 – TOLERÂNCIA SALINA E TÉRMICA DO PEIXE
AMAZÔNICO *Astronotus ocellatus* (PERCIFORMES, CICHLIDAE)
INTRODUZIDO NOS EVERGLADES, FLÓRIDA, EUA***

*artigo preparado para submissão na revista: Marine and Freshwater Research

SUMÁRIO

CAPÍTULO 3 - Salinity and temperature tolerance of amazon Oscar *Astronotus ocellatus* (Perciformes, Cichlidae) introduced in Everglades, Florida, USA 79

SUMÁRIO.....	80
RESUMO	81
INTRODUÇÃO.....	82
MATERIAL E MÉTODOS.....	84
Coleta e aclimação	84
Delineamento experimental.....	84
Experimento de tolerância à salinidade abrupta	85
Experimentos de salinidade crônica + temperatura.....	85
Experimentos de Crítical Thermal Maximum e Minimum (CTMáx e CTMin)	86
Análise Estatística	86
RESULTADOS	86
Experimento de tolerância à salinidade abrupta	87
Experimentos de salinidade crônica + temperatura.....	88
Experimentos de CTMáx e CTMin	90
DISCUSSÃO.....	91
REFERÊNCIAS	96

RESUMO

Oscar (*Astronotus ocellatus*) é nativo da bacia Amazônica e considerado um peixe invasor nos Everglades. Flórida, EUA. Embora esteja presente na Flórida há décadas, pouco se sabe a respeito de suas tolerâncias ecofisiológicas. Os indivíduos de Oscar foram submetidos a condições térmicas críticas (CT) e testes de tolerância à salinidade abruptos e crônicos. Nos experimentos de salinidade abrupta, os peixes foram diretamente transferidos de água doce para as salinidades de 14, 16, 18, 20 ppt, e mantidos por 7 dias ou até a morte. Os peixes em água doce controles e de 14 ppt sobreviveram durante 7 dias. Na salinidade de 16 ppt, os peixes maiores sobreviveram por cerca de 7 dias, mas os menores morreram dentro de 4 dias. Em 18 ppt os peixes morreram dentro de 2 dias, e em 20 ppt morreram em menos de 12 horas. Para experimentos crônicos, a salinidade foi aumentada gradualmente (2 ppt/dia) até atingir os valores de 14, 16, 18 e 20 ppt. Os peixes foram mantidos nestas condições durante 30 dias. Os experimentos foram realizados em duas temperaturas de água diferentes: 18°C e 28 °C. Peixes a 18°C morreram dentro de 9 dias em 14 ppt, menos de 3 dias em 16 ppt, 2 dias a 18 ppt e menos de 10 horas em 20 ppt. Para o teste a 28°C, os peixes sobreviveram por 30 dias em condições controles, enquanto apenas 30% sobreviveram aos 30 dias em 16 ppt. Adicionalmente, em 18 ppt os peixes sobreviveram em média 9 dias e em 20 ppt morreram dentro de 2 dias. Para CT máximo e mínimo a temperatura foi elevada ou diminuída 1°C/hora, até atingir a temperatura letal. Os peixes aclimatados a 25°C morreram em 9°C na CTMin e 40°C na CTMáx, enquanto os aclimatados à 20°C obtiveram CTMin de 9°C, e os aclimatados à 30°C apresentaram CTMáx de 41°C. Os resultados mostraram que *A. ocellatus* pode tolerar uma ampla variação de temperatura, assim como de salinidades até 20 ppt para um curto período de tempo e até 16 ppt durante cerca de um mês, especialmente em ambientes de água quente. A sobrevivência foi menor quando a salinidade foi combinada com temperaturas frias, mas Oscar se demonstrou resistente quando testado em águas salobras quentes. Apesar de esta espécie ser nativa de água doce e quente na Amazônia, concluiu-se que a ecofisiologia não irá dificultar a sua dispersão para águas salobras quentes, e até mesmo mais frias, como encontrados nos Everglades.

Palavras-chave: Florida, Ecofisiologia, Espécies Invasoras

INTRODUÇÃO

As invasões biológicas são um dos problemas mais impactantes nos sistemas ecológicos, causando danos como a degradação do habitat, hibridação, colapso de comunidades, propagação de doenças, e impactos econômicos para atividades humanas (Lodge 1993, Pimentel 2002, Gozlan 2009, Vitule et. al. 2009, Cucherousset e Olden 2011, Ricciardi e MacIsaac 2011). Apesar da grande preocupação no meio científico com as invasões, ainda há uma grande taxa de introdução de peixes em novos locais ao redor do mundo, causada principalmente por atividades como aquicultura, aquariofilia e pesca esportiva (Gozlan 2008). Por estas razões, os peixes são os animais com maior número de introduções em locais não nativos no mundo (Gozlan 2008, 2009).

A indústria de peixes ornamentais é responsável por cerca de 21% das introduções de peixes (Gozlan 2008). Estas espécies importadas são geralmente criadas em pisciculturas ou lojas de aquariofilia e revendidos por motivos de lazer ou ornamentais. Nesses locais de criação há um grande número de escapes acidentais ou até mesmo os peixes são liberados de forma indiscriminada pelos proprietários finais, tornando-se invasores potenciais nestes novos locais (Copp et al., 2005, Keller e Lodge 2007, Gertzen et al. 2008, Gozlan 2009). Mesmo o processo de invasão sendo difícil e desafiador, alguns peixes podem sobreviver as barreiras fisiológicas e ecológicas e se dispersar com sucesso no novo ambiente (Gozlan de 2009, Blackburn et al. 2011, Pool e Olden 2012, Capps e Flecker 2013).

O Oscar *Astronotus ocellatus* (Cichlidae) é nativo da América do Sul tropical, sendo naturalmente encontrado na Bacia Amazônica do Peru, Colômbia e Brasil (Kullander 1986, 2003), porém se espalhou por todo o mundo por ser um peixe bastante apreciado na aquariofilia (Fury e Morello 1994, Maceda-Veiga et al. 2014). Relatos de sua introdução ou estabelecimento são conhecidos nos Estados Unidos, Porto Rico, Austrália, Polônia, Cingapura e bacias hidrográficas sul do Brasil (Ng et al. 1993, Fury e Morello 1994, Nowak et al. 2008, Webb 2008, Julio Jr. et al. de 2009, Nico et al. 2014). Em locais nativos a espécie vive em rios de água doce e quente, tanto em rios de cor branca que são ricos em suspensões sólidas e íons com um pH neutro, como em habitats de águas escuras (Rio Negro) com acidez acentuada e pobres em íons (Sioli 1984, De Pinna 2006). Oscar é um competidor e predador agressivo, também conhecido por ser um peixe muito tolerante a mudanças físicas de água (baixo pH e concentração

de oxigênio, alta temperatura e salinidade), portanto, é caracterizado como uma ameaça potencial para os locais e comunidades invadidas (Courtenay e Hensley 1979, Val et al. 2006, Nico et al. 2014). A alta resistência a estressores ambientais torna Oscar um peixe muito valorizado na indústria ornamental, mas também faz com que seja uma grande ameaça em locais de potencial invasão (Gozlan 2009).

Em um cenário de mudanças climáticas, alterações na temperatura da água podem resultar em uma redistribuição de espécies de peixes, uma vez que as águas quentes podem facilitar a propagação de peixes não-nativos para locais de maior latitude e que podem acabar se tornando invasores nestes novos locais (Magnuson 2002, Shuter e Lester 2004 . Sharma et al. 2007, Rahel e Olden 2008).

Sendo um ciclídeo, a espécie pode ser considerada secundariamente de água doce em sua história evolutiva, o que significa que, mesmo se caracterizando por ser um peixe estritamente de água doce, segundo sua história evolutiva ele pode tolerar águas salobras por períodos curtos (Myers 1949, Val et al. 2006). O uso de águas salobras como ponte dispersão em estuários (via elevação do nível do mar, flutuações de maré e/ou inundações por tempestades) pode ser um potencial caminho para invasões de peixes, e causam consequências a longo prazo para as comunidades invadidas (Brown et al., 2001, 2007, Schofield et al. . 2011, Gutierre et al. 2014). Os resultados dos testes de tolerância à salinidade permitirá a compreensão científica de como o Oscar responde tanto a exposição aguda e crônica a situação de estresse. Testando combinações de salinidade e temperatura é possível compreender melhor a tolerância desta espécie quando diferentes estressores agem em conjunto. Estes experimentos podem proporcionar informação que são essenciais para a prevenção de invasões futuras (Lexer et al., 2003, Hampe e Petit 2005, Rahel e Olden 2008, Schofield et al. 2011, Gutierre et al. 2014).

Para este estudo, foi testada a tolerância de temperatura e salinidade do ciclídeo invasor Oscar, proveniente dos Everglades, Flórida (Estados Unidos), para fazer inferências a respeito de seus limites de tolerância e capacidade de invasão. Pretendemos responder às seguintes questões: sendo um peixe invasor em algumas localidades, a espécie tem ampla plasticidade fisiológica justificando seu potencial invasivo? Quais são os seus limites de tolerância a temperatura e salinidade? As tolerâncias ajudam a prever novas invasões através da compreensão da plasticidade

térmica e salina da espécie? São salinidade e temperatura fatores limitantes para a invasão desta espécie?

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e aclimação

Os peixes foram comprados de uma piscicultura na Flórida (Dade City Tropicals Inc.) em Março e Abril de 2014, e foram transportados para o laboratório do US Geological Survey em Gainesville, Florida, EUA. No laboratório, os peixes foram aclimatados em tanques (378 L) com água declorada (Floridan aquífero, salinidade 0.2 ppt, aqui considerada '0', ou água doce) por duas semanas. Durante a aclimação a temperatura variou de 21°C a 25°C, a aeração era constante e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes (Zeigler® High-Protein Finfish Starter Feed Pellet). Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para as respectivas condições experimentais (ver abaixo). Dois tamanhos de Oscar foram utilizados, pequeno ($5,9 \pm 0,05$ cm) e grandes ($9,3 \pm 0,07$ cm). Ambos tamanhos eram estágios juvenis, mas os peixes menores tinham aproximadamente dois meses de idade e os maiores em torno de seis meses.



Figura 1. Espécies *Astronotus ocelatus*. Fonte: Google Images.

Delineamento experimental

A metodologia dos experimentos foi baseada em Schofield et al. (2011). A tolerância à salinidade foi determinada com experimentos agudos e crônicos. Antes dos experimentos, cada peixe era pesado (g), medido (cm, comprimento total), e colocado em caixas de plástico (1,5 L, 17 x 14 x 11 cm; um peixe por caixa) completadas com água doce declorada. Cada caixa recebeu aeração constante e era coberta de três lados com material de blindagem (para evitar que os peixes tivessem contato com os peixes de caixas ao lado), e coberta por cima com uma tampa. Os peixes foram aclimatados nas

caixas durante 3 dias. Sal sintético marinho de aquário (Crystal Sea® Marinemix, Marine Enterprises International, Baltimore, MD, EUA) foi misturado com água doce para elevação da salinidade. A salinidade foi medida com um medidor multiparâmetros YSI Professional Plus (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, EUA, $\pm 0,2$ ppt). Os peixes foram alimentados duas vezes por semana no experimento crônico, e não foram alimentados no experimento de salinidade abrupta e temperatura crítica. As trocas de água (troca total) aconteciam depois da alimentação para manter a qualidade da água e eliminar os resíduos na parte inferior de cada caixa. Fotoperíodo foi 12:12 L:D durante os experimentos.

Experimento de tolerância à salinidade abrupta

Indivíduos de *A. ocellatus* foram abruptamente transferidos da condição controle (água doce) para as salinidades experimentais (0 [controle], 14, 16, 18, 20 ppt, $n= 5$ pequenos e 5 grandes para cada salinidade, 50 total). Os peixes foram verificados de hora em hora nas primeiras 8 horas e, em seguida, duas vezes por dia durante 7 dias ou até que morressem. A temperatura da água foi medida todos os dias e mantida em 24 ± 1 °C durante o período experimental. Não houve troca de água durante esse experimento e os peixes não foram alimentados.

Experimentos de salinidade crônica + temperatura

Experimentos crônicos foram realizados com temperaturas da água quente (28 ± 1 °C) simulando verão, e fria (18 ± 1 °C) simulando inverno. Para o experimento de temperatura quente, os peixes foram colocados em laboratório climatizado no qual a temperatura do ar foi mantida constantemente próxima a 28°C. Uma câmara ambiental isolada foi usada para realizar os experimentos de baixa temperatura, onde a temperatura do ar ficou constantemente próxima a 18°C. Os peixes foram expostos progressivamente ao aumento de salinidade da água (2 ppt por dia) até que todos os tratamentos atingissem a salinidade alvo (0 [controle], 14, 16, 18, 20 ppt; $n = 5$ pequenos e 5 grandes para cada salinidade em cada temperatura [quente e frio], $n = 100$ no total). Cada peixe foi mantido em suas respectivas salinidades por 30 dias ou até a morte. A temperatura da água foi monitorada várias vezes por dia durante todo o período experimental e ajustada para manter as temperaturas específicas.

Experimentos de Crítical Thermal Maximum e Minimum (CTMáx e CTMin)

Utilizou-se uma câmara ambiental de resfriamento para realizar os experimentos de baixa temperatura (Crítical Thermal Minimum, CTMin), e um grande tanque (500 L) completo de água com termostatos de aquecimento foi utilizado como “banho-maria” para realizar os experimentos de alta temperatura (Crítical Thermal Maximum, CTMáx). Os peixes foram aclimatados em caixas individuais em temperaturas de aclimação experimentais (20 °C e 25 °C para CTMin, e de 25°C e 30°C para CTMáx) durante 4 dias (n=10 pequenos e 10 grandes experimentais para cada temperatura de aclimação, n = 5 pequenos e 5 grandes controles para cada temperatura de aclimação, totalizando 120). Após o período de aclimação, a temperatura foi aumentada ou diminuída em 1°C/hora, até alcançar as temperaturas térmicas críticas (CTMáx e CTMin, baseado em Beitinger et al. 2000, adaptado por Schofield et al. 2010).

Análise Estatística

A sobrevivência dos indivíduos nos testes de tolerância à salinidade foi avaliada usando a função não-paramétrica de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier 1958). Para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevivência obtidas pelos testes de Kaplan-Meier, o teste de log-rank foi usado (Kleinbaum e Klein 1997). Foi utilizado o teste de Two-way ANOVA para detectar as diferenças entre as temperaturas de aclimação, os tamanhos do corpo e a interação entre os dois fatores nos experimentos de temperatura crítica máxima e mínima (CTMáx e CTMin). CTMin e CTMáx foram testadas separadamente, utilizando um design fatorial 2x2 com dois níveis para cada fator. Para CTMin, temperaturas de aclimação eram 20°C x 25°C, enquanto que para CTMáx, temperaturas de aclimação eram 25°C x 30°C. O segundo fator, o tamanho do corpo, era grande x pequeno. A significância estatística era considerada quando $P < 0,05$ (SPSS versão 13.0 e SigmaPlot versão 11.0).

RESULTADOS

Massa e comprimento não variaram entre os experimentos (crônico, abrupto, térmico), salinidade (0, 14, 16, 18, 20 ppt) ou temperaturas (CTMáx e CTMin) (One-way ANOVA, $P > 0,05$). A média da massa para os peixes menores (nTotal = 130) foi 3,87 g ($\pm 1,19$ SD; intervalo 1,6 - 7,1 g) e 16,33 g ($\pm 3,99$ SD; intervalo de 8,2 - 27,6 g) para peixes maiores (n = 130). Comprimento total médio foi de 5,95 cm ($\pm 0,59$ SD,

variando 3,5 - 7,3 cm) para os peixes menores (n=130) e 9,36 centímetros ($0,77 \pm \text{SD}$; intervalo de 8,1 - 11,8 cm) para os peixes maiores (n = 130).

A temperatura da água no experimento de tolerância a salinidade era em média de $24,3^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ SD; faixa de $22 - 26^{\circ}\text{C}$). Para os experimentos de salinidade crônica no calor a média de temperatura da água foi de $27,8^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ SD; faixa de $26,4^{\circ}\text{C} - 28,6^{\circ}\text{C}$), e para os experimentos de salinidade crônica no frio a média da temperatura da água foi de $17,7^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ SD; faixa de $16,5^{\circ}\text{C} - 18,7^{\circ}\text{C}$).

Experimento de tolerância à salinidade abrupta

No experimento de tolerância à variação de salinidade abrupta nenhum peixe controle morreu durante o período experimental. Após a transferência direta para 14 ppt, todos os peixes sobreviveram por 7 dias e apresentaram recuperação posterior após retornarem para água doce. Peixes grandes e pequenos apresentaram diferentes resultados de sobrevivência em salinidade de 16 ppt e 20 ppt ($P < 0,05$). Em 16 ppt, os peixes menores sobreviveram até 4 dias (103 horas), e os maiores sobreviveram por 7 dias e apresentaram recuperação após serem transferidos para água doce. Os indivíduos de Oscar pequenos que foram transferidos abruptamente para 18 ppt apresentaram mortalidade dentro de 2 dias (48 horas), e os maiores dentro de 4 dias (103 horas). Os peixes pequenos que foram transferidos para 20 ppt morreram em menos de 11 horas, enquanto a maioria dos maiores morreram dentro de 24 horas após a mudança de salinidade, com apenas um indivíduo sobrevivendo até 31 horas (Fig. 2). A sobrevivência dos peixes pequenos foi diferente entre as salinidades 16, 18 e 20 ppt ($P < 0,05$), e nas salinidades 18 e 20 ppt ($P < 0,05$) para os peixes de grandes. A média de tempo de sobrevivência (95% de intervalo de confiança, IC) nos tratamentos foram: 87 ± 5 horas (IC = 77-97) para peixes menores em 16 ppt, 34 ± 4 horas (CI = 26-41) para peixes menores em 18 ppt, 11 horas (IC = 11-11) para peixes menores em 20 ppt, 60 ± 11 horas (CI = 39-81) para peixes grandes em 18 ppt, e 25 ± 1 hora (CI = 23-28) para peixes grandes a 20 ppt.

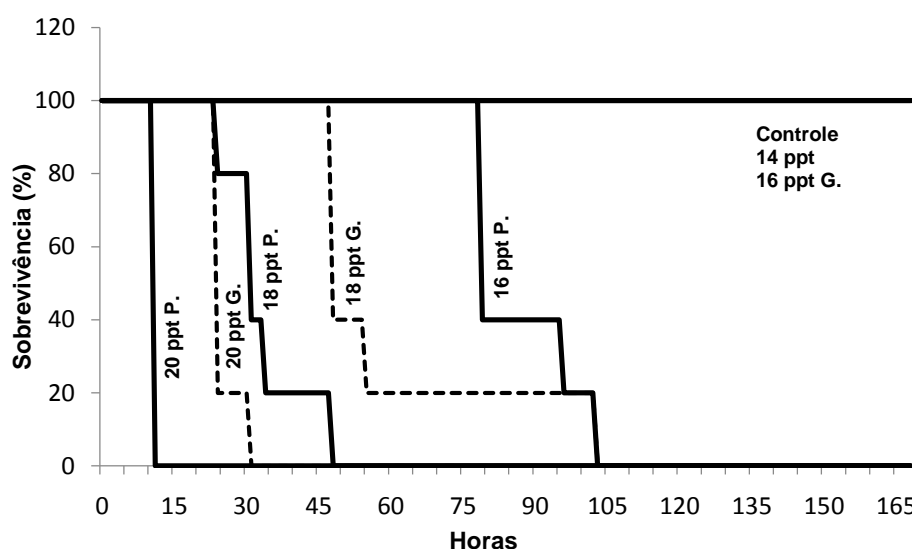


Figura 2. Sobrevivência de *A. ocellatus* após transferência abrupta de água doce para as salinidades experimentais de 0 [controle], 14, 16, 18 e 20 ppt (n=5 peixes pequenos e 5 grandes para cada salinidade). Peixes pequenos são representados pela linha contínua (-) e peixes grandes pela linha pontilhada (--).

Experimentos de salinidade crônica + temperatura

Os resultados de salinidade crônica não apresentaram diferenças estatísticas para os peixes pequenos e grandes ($P > 0,05$). A temperatura experimental (temperatura dos testes quente ~ 28 e frio $\sim 18^{\circ}\text{C}$) afetaram diretamente os tempos de sobrevivência, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$). Nos experimentos de temperatura quente, peixes expostos a 14 ppt sobreviveram durante todos os 30 dias. Os Oscars pequenos em 16 ppt apresentaram mortalidade durante o período experimental, sendo que apenas 40% sobreviveram os 30 dias experimentais. Os peixes maiores em 16 ppt apresentaram apenas 20% de sobrevivência após 30 dias. Peixes menores em 18 ppt sobreviveram até 5 dias experimentais (120 horas), e os maiores em até 12 dias (288 horas). E a 20 ppt, 80% dos peixes menores morreram dentro de 24 horas, e todos os maiores morreram no prazo de 48 horas (Fig. 3A). A sobrevivência dos peixes pequenos e grandes foi diferente entre as salinidades de 18 e 20 ppt ($P < 0,05$). A média de tempo de sobrevivência (95% de intervalo de confiança, IC) nos tratamentos foram: 638 ± 73 horas (IC = 495-781) para os maiores de 14 ppt, 576 ± 76 horas (CI = 426-726) para peixes menores de 16 ppt e 398 ± 95 horas (IC = 211-585) para peixes grandes em 16 ppt, 72 ± 17 horas (CI = 39-105) para peixes menores de 18 ppt e 216 ± 31 horas (CI = 155-277) para peixes grandes em 18 ppt, 29 ± 5 horas (IC = 19-38) para peixes menores a 20 ppt e 44 ± 4 horas (CI = 37-51) para peixes grandes a 20 ppt (Fig 3C.).

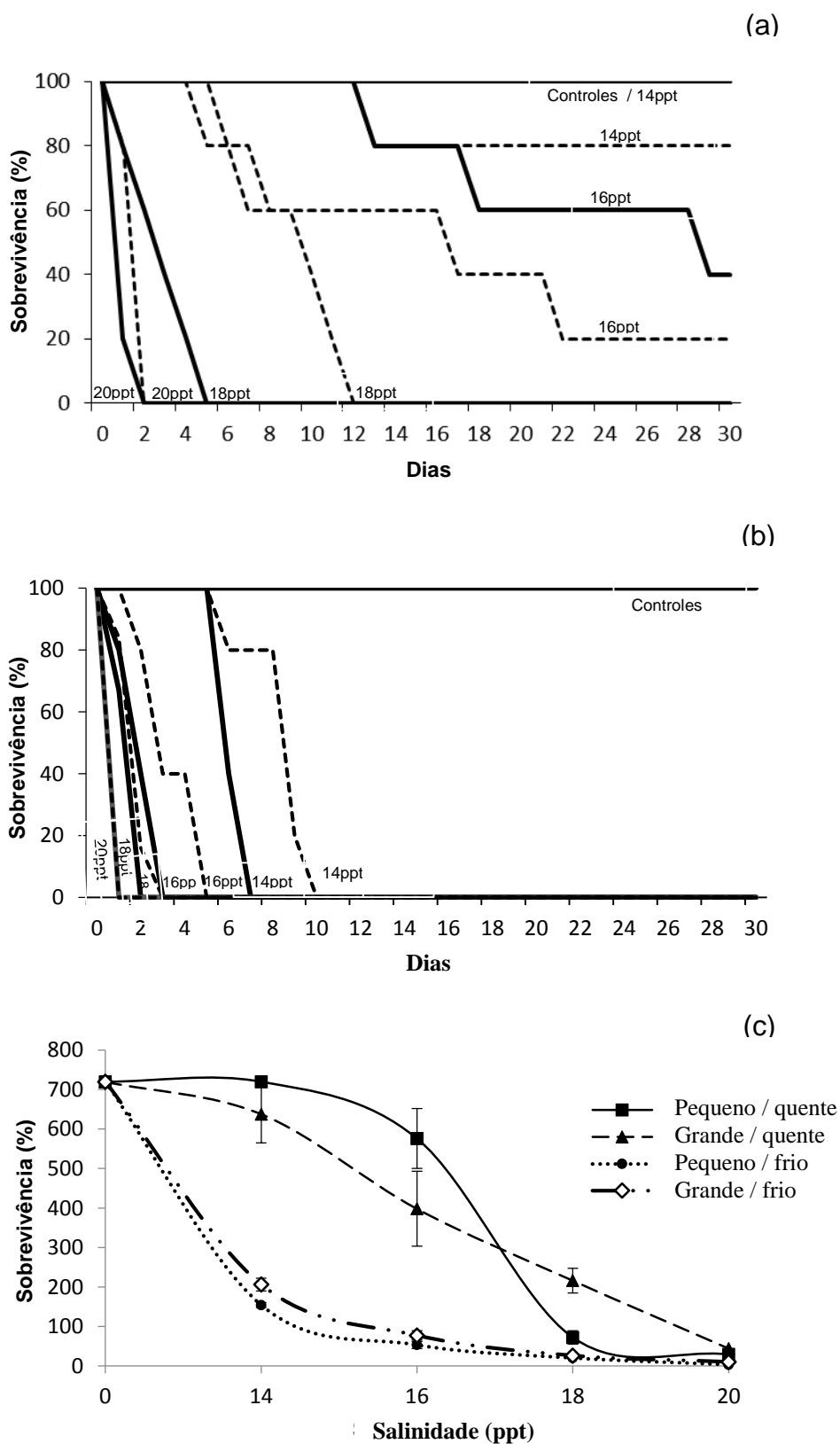


Figura 3. Sobrevivência de *A. ocellatus* expostos cronicamente a diferentes salinidades: 0 [controle], 14, 16, 18 e 20 ppt. Foram utilizadas duas temperaturas experimentais constantes: quente ~ 28°C (a) e fria ~ 18°C (b). N= 5 peixes pequenos e 5 grandes para cada salinidade em cada temperatura experimental. As médias do tempo de sobrevivência dos diferentes tamanhos de peixes nas diferentes temperaturas estão representadas no gráfico (c). Peixes pequenos são representados pela linha contínua (—) e peixes grande pela linha pontilhada (---).

Para os experimentos de tolerância à salinidade crônica em temperatura fria, apenas os peixes controles sobreviveram os 30 dias experimentais. Em 14 ppt, peixes menores morreram no prazo de 7 dias (168 horas) e os maiores morreram dentro de 10 dias (240 horas). Em 16 ppt, os peixes menores sobreviveram por um máximo de 72 horas, e os maiores de até 120 horas. Pequenos Oscar expostos a 18 ppt morreram todos em 24 horas, enquanto os maiores morreram dentro de 48 horas. Apenas um peixe pequeno sobreviveu por 3 horas em 20 ppt, e os maiores não sobreviveram mais de 10 horas (Fig. 3B). Apenas um peixe pequeno dos 10 que deveriam ir a 20 ppt sobreviveu a elevação de salinidade até esta salinidade, os outros 9 morreram em 18 ppt, então eles foram contados como peixe experimental de 18 ppt. A sobrevivência dos peixes foi diferente entre as salinidades 14, 16 e 18 ppt ($P < 0,05$) para os peixes pequenos, e salinidade 14, 16, 18 e 20 ppt para os peixes grandes. A média de tempo de sobrevivência (95% de intervalo de confiança, IC) nos tratamentos foram 154 ± 6 horas (IC = 142-165) para peixes menores em 14 ppt, 206 ± 16 horas (CI = 174-238) para os grandes a 14 ppt, 53 ± 9 horas (IC=35-70) para peixes menores em 16 ppt, 77 ± 12 horas (CI = 54-100) para peixes grandes em 16 ppt, 20 ± 2 horas (CI = 15-24) para peixes menores em 18 ppt, 26 ± 5 horas (IC = 17-35) para peixes grandes em 18 ppt, 3 horas (CI = 3-3) para peixes menores em 20 ppt e 10 ± 1 hora (CI = 9-10) para peixes grandes em 20 ppt. (Fig. 3C). Durante os experimentos de salinidade crônica no frio, apenas os peixes controles se alimentaram normalmente. Peixes expostos aos tratamentos de salinidade quase não se alimentaram no período experimental.

Experimentos de CTMáx e CTMin

Para CTMin, peixes pequenos aclimatados a 20°C e 25°C não apresentaram diferenças entre as temperaturas de aclimação, enquanto peixes grandes aclimatados a 25°C apresentaram maior CTMin ($10,45 \pm 1,51$) do que os de 20°C ($8,78 \pm 0,65$). Além disso, os peixes grandes apresentaram maior CTMin ($10,45 \pm 1,51$) do que os menores ($9,37 \pm 0,75$) quando aclimatados a 25°C, e para os peixes aclimatados a 20°C não houve diferença entre pequenos e grandes. Para CTMáx peixes grandes aclimatados a 30°C ($41,05 \pm 0,14$) apresentaram maior CTMáx que o aclimatados a 25°C ($40,76 \pm 0,23$), enquanto os peixes pequenos não apresentaram diferenças entre as temperaturas de aclimação de 25°C e 30°C. Peixes pequenos a 25°C e 30°C ($40,44 \pm 0,17$ e $40,50 \pm 0,29$) apresentaram menor CTMáx que os maiores ($40,76 \pm 0,23$ e $41,05 \pm 0,14$) em ambas as temperaturas de aclimação ($P < 0,05$) (Tab. 2). A temperatura de aclimação foi um

fator significativo que afetou a CTMin ($P < 0,05$; Tab. 1a) e a interação da temperatura de aclimação e o tamanho do corpo obteve interação significativas na CTMin ($P < 0,05$; Tab. 1a). Para CTMáx o tamanho do corpo superior refletiu em maior CTMáx, sendo esse em um fator de interação significativo ($P < 0,001$; Tab. 1b), assim como a temperatura de aclimação influenciou nos valores CTMáx em uma interação significativa ($P < 0,05$; Tab. 1b)

Tabela 1. Análise de Two-way ANOVA demonstrando os efeitos da temperatura de aclimação (a: 20°C x 25°C; b: 25°C x 30°C), e tamanho corporal (pequeno x grande) a interação dos dois fatores na sobrevivência de *Astronotus ocellatus*. (a) CTMin e (b) CTMáx.

Fonte de Variação	df	SS	MS	F	P
<i>(a) CTMin</i>					
Tamanho corporal	1	0,961	0,961	1,067	0,309
Temperatura de Aclimação	1	8,1	8,1	8,993	0,005
Tamanho corporal x Temp. de Aclimação	1	5,929	5,929	6,582	0,015
Residual	36	32,426	0,901		
Total	39	47,416	1,216		
<i>(b) CTMáx</i>					
Tamanho corporal	1	1,892	1,892	40,237	<0,001
Temperatura de Aclimação	1	0,306	0,306	6,512	0,015
Tamanho corporal x Temp. de Aclimação	1	0,132	0,132	2,812	0,102
Residual	36	1,693	0,047		
Total	39	4,024	0,103		

Tabela 2. Temperatura Crítica Máxima e Mínima (média \pm EP) de *Astronotus ocellatus* pequenos (~ 5.9 cm) e grandes (~ 9.3 cm) aclimatados a 20°C, 25°C e 30°C por 5 dias (n = 20). Diferença estatística considerada $P < 0.05$. * diferença entre pequenos x grandes na mesma temperatura de aclimação. # diferença entre as temperatura de aclimação no mesmo grupo de tamanho corporal.

Temperatura de Aclimação	Temperatura Fria		Temperature Quente	
	20°C	25°C	25°C	30°C
Pequenos	9.24 \pm 0.58	9.37 \pm 0.75*	40.44 \pm 0.17*	40.50 \pm 0.29*
Grandes	8.78 \pm 0.65	10.45 \pm 1.51#	40.76 \pm 0.23	41.05 \pm 0.14#

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a espécie *A. ocellatus* é tolerante à águas salobras de 14 a 16 ppt tanto em transferências abruptas quanto crônicas. A espécie teve maior sucesso de sobrevivência em águas quentes quando comparada a águas frias, especialmente quando haviam estresses de salinidade e temperatura agindo em conjunto.

O tamanho corporal dos peixes influenciou nas suas tolerâncias ambientais. Mesmo que ambos os tamanhos utilizados no trabalho sejam considerados juvenis, foi demonstrado que houve uma variação intraespecífica na tolerância e no potencial de resiliência à estressores para os diferentes tamanhos corporais dos peixes. Mas esse tipo de variação parece ser espécie-específico visto que existem estudos que mostram tanto que o tamanho corporal é relevante em experimentos de variação térmica (Cox 1974, Charo-Karisa et al. 2005) e salina (Boeuf e Payan 2001), quanto também existem outros estudos que contradizem mostrando que o tamanho corporal não é um fator diferencial na tolerância dos peixes (Ospina e Mora 2004, Recsetar et al. 2012). As diferenças encontradas para o Oscar podem ser atribuídas ao fato de que peixes menores possuem uma maior relação área de superfície / volume (Hutchison 1976, Recsetar et al. 2012) que pode fazer com que esses indivíduos possuam uma resposta mais intensa e negativa à variações térmicas e salinas. Como pôde ser observado nos resultados, indivíduos de Oscar pequenos, em geral, demonstraram menor tolerância às variações de temperatura e salinidade quando comparados aos animais grandes, demonstrando que juvenis de menor porte são menos resistentes que os de maior porte. Alguns estudos demonstraram que indivíduos grandes de *A. ocellatus* são mais resistentes à hipóxia que indivíduos pequenos, e os autores sugerem que essa resistência pode ser explicada pelo aumento da capacidade anaeróbica dos indivíduos de maior porte (Almeida-Val et al. 2000, Val et al. 2006). Como em altas temperaturas os níveis de O₂ diminuem isso poderia explicar o porquê de peixes menores demonstrarem uma menor resistência nos experimentos de altas temperaturas, quando comparados aos peixes maiores.

Os peixes da Ordem Perciformes (na qual se inclui o *A. ocellatus*), são considerados primariamente marinhos e acabaram por invadir corpos de água doce secundariamente em suas histórias evolutivas (Myers 1949, Nelson 2006). Devido a essa história evolutiva, são peixes considerados notoriamente eurihalinos, como já demonstrado para outros ciclídeos (mesma família do Oscar) como *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), *Oreochromis mossambicus* (tilápia Mozambique), *Geophagus brasiliensis* (Cará), e *Hemichromis letourneuxi* (ciclídeo jóia) (Sardella et al. 2004, Langston et al. 2010, Schofield et al. 2011, Lowe et al. 2012, Gutierrez et al. 2014). Na bacia Amazônica, de onde é nativo, *A. ocellatus* é exclusivamente de água doce, mas como outros ciclídeos de água doce, demonstrou alta tolerância à águas salobras, acalcando até 20 ppt por 11 horas, e cerca de 15 ppt por uma semana quando transferido abruptamente para estas salinidades. Esse resultados se assemelham aos

encontrados para *O. niloticus* que também demonstrou excelente taxa de sobrevivência em transferências abruptas para salinidades menores que 20 ppt (Schofield et al. 2011, Gutierrez et al. 2014), e também para *G. brasiliensis* que sobreviveu pelo menos 6 horas em transferências abruptas para 15 ppt (Freire et al. 2008, Gutierrez et al. 2014). A sobrevivência após transferências agudas pode ser relevante para prever e explicar escapes de pisciculturas e locais de criação de peixes ornamentais para novas bacias ou estuários que possuem águas salobras, ou para determinar a sobrevivência dos peixes em locais onde a salinidade pode variar drasticamente em um período curto de tempo (Langston et al. 2010, Gutierrez et al. 2014). Essa tolerância a choques agudos de salinidade também pode ser um fator de sobrevivência quando descartes inesperados de salinidade acontecem, causados por exemplos por furacões, tempestades ou atividades antrópicas (Walker 2001, Davis et al. 2004). Os resultados apresentados para o Oscar mostram que essa espécie pode sobreviver em águas salobras, porém mais informações em relação à tolerância salina da espécie, envolvendo a resistência dos ovos e o sucesso reprodutivo, são necessárias para determinar seu potencial de se estabelecer e invadir esses novos ambientes aquáticos.

A temperatura de aclimação fria (~18°C) diminuiu a habilidade dos indivíduos de Oscar de tolerar os aumentos crônicos de salinidade. Enquanto os peixes aclimatados a temperatura quente (~28°C) sobreviveram por 30 dias em 16 ppt, e cerca de 2 dias em 20 ppt, os peixes aclimatados no frio não sobreviveram mais que 11 dias mesmo na salinidade mais baixa testada de 14 ppt, e menos de 10 horas em 20 ppt. Visto que o Oscar é nativo de locais de águas doce e quentes (Fontenele 1951) e possui uma resistência a águas salobras explicada pela sua história evolutiva (Nelson 2006, Val et al. 2006), esses fatores poderiam explicar sua alta tolerância em águas salobras e de temperaturas mais altas. A interação entre salinidade e temperatura como ferramenta para entender as tolerâncias fisiológicas de peixes já foi reportada em alguns estudos que demonstraram que baixas temperaturas podem afetar a tolerância a altas salinidade para outros ciclídeos de água doce (Stauffer 1986, Schofield et al. 2010). Resultados esses encontrados por exemplo para o ciclídeo *O. niloticus* que mostrou uma sobrevivência reduzida a diferentes salinidades em temperaturas de inverno (Schofield et al. 2011). Apesar da alta resistência a elevações de salinidade geralmente encontrada em espécies de tilápia, *Oreochromis aureus* (tilápia azul) e *Tilapia zillii* (tilápia de barriga vermelha) também demonstraram uma diminuição da tolerância às variações de

salinidade quando em baixas temperaturas (11 - 16°C), comparadas a indivíduos em temperaturas médias de 23 - 28°C (Lorenzi e Schlenk 2014).

Quando variações na salinidade da água acontecem constantemente, como visto em estuários e ambientes altamente variáveis (como poças e planícies alagadas), espécies estenohalinas possuem poucas chances de sobrevivência e como consequência, dificilmente se estabelecem nesse tipo de ambiente (Ubeda et al. 2009). Porém espécies como *A. ocellatus*, que demonstrou tolerar águas salobras e possui uma ampla plasticidade fisiológica, possuem um alto potencial de dispersão nesses ambientes instáveis e suporta variações salinas sem mudanças drásticas em suas funções fisiológicas (Bringolf et al. 2005, Brown et al. 2007, Rahel 2007, Rahel e Olden 2008, Schofield et al. 2011, Gutierrez et al. 2014).

Na bacia Amazônica, *A. ocellatus* enfrenta temperaturas entre 20°C e 30°C em água doce (Fontenele 1982). Sua tolerância à hipóxia é bem documentada, sendo uma espécie considerada altamente resistente a condições de pouco oxigênio (Muusze et al. 1998, Chippari-Gomes et al. 2005). Em cativeiro, *A. ocellatus* é encontrado em temperaturas que variam de 23°C a 34°C (Silva 2010) e em locais introduzidos como na bacia do Rio Paraná, Sul do Brasil, a espécie enfrenta temperaturas que variam de 17°C a 30°C (Agostinho et al. 1995). No Sul da Flórida, nos Everglades, *A. ocellatus* é encontrado em temperaturas que variam anualmente de 13°C a 35°C ($\pm 3^\circ\text{C}$ SD; SFNRC 2014). A taxa de variação de temperatura de 1°C/hora foi determinada utilizada no presente estudo foi baseada em experimentos prévios de temperatura crítica (Ospina e Mora 2004, Schofield et al. 2010) também baseada em medições em campo onde foram encontrados rápidos esfriamentos ou aquecimentos da água na região alagada dos Everglades (Schofield et al. 2010).

Os resultados da elevação crítica de temperatura demonstraram que os indivíduos de Oscar podem sobreviver em uma faixa de temperatura que varia de 9.2°C a 41.05°C em um cenário de variação térmica de 1°C/hora. Resultados anteriores com Oscars na Flórida demonstraram que sua tolerância a baixas temperaturas era de 12,9°C em uma temperatura de aclimação de 28°C e variação térmica de 2°C/dia (Shafland e Pestrak 1982) e resultados semelhantes também foram encontrados na Austrália quando os indivíduos de Oscar foram submetidos a uma variação lenta de temperatura, 2°C a cada 76 horas, alcançaram uma faixa de tolerância de 12,7°C a 40,1°C (Webb 2008). Esses experimentos foram realizados em uma taxa de variação menor que as apresentadas no presente trabalho, com dias de intervalo entre as mudanças de um grau,

o que pode explicar as diferenças de tolerância à baixas temperaturas. O Oscar é um peixe nativo de regiões tropicais de águas quentes e mesmo assim apresentaram uma tolerância ampla a baixas temperaturas, variação esta que também foi registrada para outros ciclídeos invasores como *Cichlasoma urophthalmus* (9.5°C), espécie nativa de águas tropicais quentes da América Central, *Hemichromis letourneuxi* (9.5°C) e *H. lifalili* (9.2°C), ambos peixes tropicais nativos da África, e *Tilapia mossambica* (9.5°C) da África Tropical e sub-Tropical (Shafland e Pestrak 1982, Webb 2008, Schofield et al. 2010). Quanto ao limite máximo de temperatura crítica, alguns ciclídeos como *Aequidens pulcher* (40.6°C) de águas quentes da América Central, *Heros severus* (40.2°C) também da bacia Amazônica e *Etilapia suratensis* (~41°C) nativo da região Tropical do Sri Lanka, apresentam tolerâncias similares às encontradas para o Oscar (Rajaguru e Ramachandran 2001, Webb 2008).

Em um cenário de mudanças climáticas, quando os sistemas aquáticos pode se tornar mais quentes, essas espécies invasoras eurytérmicas passam a ter grandes chances de se estabelecer em novos locais com temperaturas mais quentes (Rahel e Olden 2008, Chang et al. 2009). O sucesso de ocupação de novos ambientes por espécies invasoras está ligado a características da história de vida e pré-adaptações fisiológicas e evolutivas (Shea e Chesson 2002, Schofield e Nico 2009). Espécies como o Oscar, um peixe de águas doce e quentes, podem tolerar uma ampla variação de salinidade e temperatura, demonstrando uma grande plasticidade fisiológica que pode ser usada na dispersão para novos locais para propósito de sobrevivência e/ou reprodução, e também para a possível utilização de estuários ou locais previamente considerados como barreirais, como pontes de dispersão (Brown et al. 2001, 2007, Schofield et al. 2011, Gutierrez et al. 2014).

Foi demonstrado que a espécie *A. ocellatus* pode tolerar amplas variações de temperatura (9°C - 41°C) e salinidades intermediárias (0 – 20 ppt). Esta espécie também pode utilizar águas salobras e quentes para invadir com sucesso e se dispersar por novos ambientes a longo prazo, mas também pode utilizar águas salobras frias para dispersões rápidas através de bacias e corpos de água.

Agradecimentos

Agradecemos a J. Schulte e D. Pecora pela ajuda nos experimentos de laboratório. S. Ruessler e W. Hyde pelo fornecimento e assistência na estruturação dos laboratórios. O

estudo foi amparado pelo US Geological Survey, Invasive Species Program and the Southeast Ecological Science Center. Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as regulações do IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee; approved protocol USGS/SESC 2014-03).

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A. A., Vazzoler, A. E. A. M., and Thomaz, S. M. (1995). The high river Paraná Basin: Limnological and Ichthyological aspects. In 'Limnology in Brazil' (Eds J. G. Tundisi, C. E. M. Bicudo, and T. Matsumura-Tundisi.) pp 59-103. (ABC/SBL: Rio de Janeiro).
- Almeida-Val, V.M. F., Val, A. L., Duncan, W. P., Souza, F. C. A., Paula-Silva, M. N., and Land, S. (2000). Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): Contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Comparative Biochemistry* **125**, 219–226.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., and McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* **58**, 237–275.
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., Wilson, J. R. U. and Richardson, D. M. (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **26**, 333–339.
- Boeuf, G., and Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **130**, 411-423.
- Bringolf, R. B., Kwak, T. J., Cope, W. G., and Larimore, M. S. (2005). Salinity tolerance of flathead catfish: implications for dispersal of introduced populations. *Transactions of the American Fisheries Society* **134**, 927-936.
- Brown, J. A., Moore, W. M., and Quabius, E. S. (2001). Physiological effects of saline waters on zander. *Journal of Fish Biology* **59**, 1544–1555.
- Brown, J. A., Scott, D. M., and Wilson R. W. (2007). Do estuaries act as saline bridges to allow invasion of new freshwater systems by non-indigenous fish species? In 'Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats' (Ed F. Gherardi.) pp. 401-414. (Springer, Dordrecht.)

- Capps, K. A. and Flecker, A.S. (2013). Invasive aquarium fish transform ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280** (1769), 20131520.
- Chang, A. L., Grossman, J. D., Spezio, T. S., Weiskel, H. W., Blum, J. C., Burt, J. W., Muir, A. A., Piovia-Scott, J., Veblen, K. E., and Grosholz, E. D. (2009). Tackling aquatic invasions: risks and opportunities for the aquarium fish industry. *Biological Invasions* **11**, 773-785.
- Charo-Karisa, H., Rezk, M. A., Bovenhuis, H., Komen, H. (2005). Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* **249**, 115-123.
- Chippari-Gomes, A.R., Gomes, L.C., Lopes, N.P., Val, A.L, Almeida-Val, V.M.F. (2005). Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **141**(3), 347-355.
- Copp, G. H., Wesley, K. J., and Vilizzi, L. (2005). Pathways of ornamental and aquarium fish introductions into urban ponds of Epping Forest (London, England): the human vector. *Journal of Applied Ichthyology* **21**, 263-274.
- Courtenay, W. R., Jr., and Hensley, D. A. (1979). Survey of introduced non-native fishes. Phase I Report. Introduced exotic fishes in North America: status 1979. Report Submitted to National Fishery Research Laboratory, U.S. Fish and Wildlife Service, Gainesville, FL.
- Cox, D. K. (1974). Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In 'Thermal Ecology'. (Eds J. W. Gibbons, R. R. Sharitz.) pp. 158-163. (National Technical Information Service, CONF-730505: Springfield, VA).
- Cucherousset, J., and Olden, J. D. (2011). Ecological impacts of non-native freshwater fishes. *Fisheries* **36**, 215-230.
- Davis, S. E., Cable, J. E., Childers, D. L., Coronado-Molina, C., Day, J. W., Hittle, C. D., Madden, C. J., Reyes, E., Rudnick, D., and Sklar, F. (2004). Importance of episodic storm events in controlling ecosystem structure and function in a Gulf Coast Estuary. *Journal of Coastal Research* **20**, 1198-1208.
- De Pinna, M. C. C. (2006). Diversity of tropical fishes. In 'The Physiology of Tropical Fishes'. (Eds A. L., Val, V M. F., Almeida-Val, and D. J. Randall.) pp. 47-84 (Elsevier: Amsterdam)
- Evans, D.H., and Claiborne, J.B. (2009). Osmotic and ionic regulation in fishes. In 'Osmotic and ionic regulation: cells and animals'. (Ed D.H. Evans). pp. 295-366. (CRC Press, Taylor and Francis Group: Florida)

- Evans, D. H., Piermarini, P. M., and Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* **85**, 97-177.
- Fontenele, O. (1951). Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae) em cativeiro. Aparelho de reprodução. Hábitos de desova e prolificidade. *Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro* **11**(4), 467-484
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P. T., Vitule, J. R. S., Souza, M. M., and Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **149**, 435-446.
- Fury, J.R., Morello, F.A. (1994). The contribution of an exotic fish, the Oscar, to the sport fishery of the Everglades Water Conservation Areas. *Proceedings of the Annual Conference of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies* **48**, 474-481.
- Gertzen, E., Familiar, O. and Leung, B. (2008). Quantifying invasion pathways: Fish introductions from the aquarium trade. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **65**, 1265–1273.
- Gozlan, R. E. (2008) Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? *Fish and Fisheries* **9**, 106–115.
- Gozlan, R. E. (2009) Biodiversity crisis and the introduction of non-native fish: solutions, not scapegoats. *Fish and Fisheries* **10**, 109–110.
- Gutierre, S. M. M., Vitule, J. R. S., Freire, C. A., and Prodocimo, V. (2014). Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Marine and Freshwater Research* **65**, 425-436.
- Hampe, A., and Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* **8**, 461–467.
- Hutchison, V. (1976). Factors influencing thermal tolerance of individual organisms.. In ‘Symposium Series of the National Technical Information’ (Eds G.W., Esch and R. McFarlane) pp. 10–26. (Service: Springfield, VA.)
- Julio Jr., H. F., Tós, C. D., Agostinho, A. A., and Pavanelli, C. S. (2009). A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* **7**(4), 709-718.

- Kaplan, E. L., and Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* **53**, 457-81.
- Keller, R. P., and Lodge, D. M. (2007). Species invasions from commerce in live aquatic organisms: problems and possible solutions. *BioScience* **57**, 428-436.
- Kleinbaum, D., and Klein, M. (1997). Survival analysis: a self-learning text. (Springer: New York.)
- Kullander, S. O. (1986). 'Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru'. (Swedish Museum of Natural History: Stockholm, Sweden.)
- Kullander, S.O. (2003). Family Cichlidae. In 'Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America'. (Eds R.E. Reis, S.O. Kullander, and C.J. Ferraris Jr.) pp. 605-654. (Edipucrs: Porto Alegre.)
- Langston, J. N., P. J. Schofield, J. E. Hill, and W. F. Loftus. (2010). Salinity tolerance of the African jewelfish *Hemichromis letourneuxi*, a non-native cichlid in south Florida (USA). *Copeia* **2010**(3), 475-480..
- Lexer, C., Welch, M. E., Murphy, J. L., and Rieseberg, L. H. (2003). Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs): Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Molecular Ecology* **12**, 1225-1235.
- Lodge, D. M. (1993). Species invasions and deletions. In 'Biotic Interactions and Global Change'. (Eds P. M., Kareiva, J. G., Kingsolver, and R. B. Hney) pp. 367-387. (Sinauer Associates: Sunderland, MA)
- Lorenzi, V., and Schlenk, D. (2014). Impacts of combined salinity and temperature extremes on different strains and species of tilapia inhabiting the watershed of the Salton Sea. *North American Journal of Aquaculture* **76**(3), 211-221.
- Lowe, M. R., Wu, W., Peterson, M. S., Brown-Peterson, N. J., Slack, W. T., and Schofield P. J. (2012). Survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia II: fundamental niche projections and invasion potential in the Northern Gulf of Mexico. *PLoS ONE* **7**, 1-10.
- Maceda-Veiga, A., Domínguez-Domínguez, O., Escribano-Alacid, J., and Lyons, J. (2014). The aquarium hobby: can sinners become saints in freshwater fish conservation? *Fish and Fisheries* **online publication** (1 Sep. 2014) [<http://doi.org/10.1111/faf.12097>]
- Magnuson, J. J. (2002) A future of adapting to climate change and variability. In: McGinn NA, ed. Fisheries in a changing climate. *Bethesda: American Fisheries Society Symposium* **32**, 273-282.

- Muusze, B., Marcon, J., van den Thillart, G., and Almeida-Val, V. M. F. (1998). Hypoxia tolerance of Amazon fish: respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **120**(1), 151-156.
- Myers, G. S. (1949). Salt-tolerance of fresh-water fish groups in relation to zoogeographical problems. *Bijdragen tot der Dierkunde* **28**, 315–322.
- Nelson, J. S. (2006). 'Fishes of the world'. 4th edn. (John Wiley and Sons: New York.)
- Ng, P. K. L., Chou, L. M., and Lam, T. J. (1993). The status and impact of introduced freshwater animals in Singapore. *Biological Conservation* **64**, 19-24.
- Nico, L., Fuller, P., and Neilson, M. (2014). *Astronotus ocellatus*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. Available at <http://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=436> [accessed 15 September 2014].
- Nowak, M., Szczerbik, P., Tatoj, K., and Popek, W. (2008). Non-native freshwater fishes in Poland: an overview. *AACL Bioflux* **1**(2), 173-191.
- Ospina, F., and Mora, C. (2004). Effect of body size on reef fish tolerance to extreme low and high temperatures. *Environmental Biology of Fishes* **70**, 339–343.
- Pimentel, D. (ed) (2002). 'Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species'. (CRC Press: Boca Raton, Florida.)
- Pool, T. K., and Olden, J. D. (2012). Taxonomic and functional homogenization of a globally endemic desert fish fauna. *Diversity and Distributions* **18**, 366-376.
- Rahel, F. J. (2007). Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* **52**, 696–710.
- Rahel, F. J., and Olden J. D. (2008). Assessing the Effects of Climate Change on Aquatic Invasive Species. *Conservation Biology* **22**(3), 521–533.
- Rajaguru, S., Ramachandran, S. (2001). Temperature tolerance of some estuarine fishes. *Journal of Thermal Biology* **26**, 41–45.
- Recsetar, M. S., Zeigler, M. P., Ward, D. L., Bonar, S. A., and Caldwell, C. A. (2012). Relationship between fish size and upper thermal tolerance. *Transactions of the American Fisheries Society* **141**(6), 1433-1438.
- Ricciardi, A., and MacIsaac, H. J. (2011). Impacts of biological invasion on freshwater ecosystems. In 'Fifty Years of Invasion Ecology: The Legacy of Charles Elton'. (ed D. M. Richardson) pp. 211-224. (Wiley-Blackwell: Oxford).

- Sardella, B. A., Matey, V., Cooper, J., Gonzalez, R. J., and Brauner, C. J. (2004). Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in 'California' Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology* **207**, 1399-1413.
- Schofield, P. J., Peterson, M. S., Lowe, M. R., Brown-Peterson, N. J., and Slack, W. T. (2011). Survival, growth and reproduction of non-indigenous Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). I. Physiological capabilities in various temperatures and salinities. *Marine and Freshwater Research* **62**, 439-449.
- Schofield, P. J., and Nico, L.G. (2009). Salinity tolerance of non-native Asian Swamp Eels (Teleostei: Synbranchidae) in Florida, USA: Comparison of three populations and implications for dispersal. *Environmental Biology of Fishes* **85**, 51-59.
- Schofield, P. J., Loftus, W.F., Kobza, R.M., Cook, M.I., and Slone, D.H. (2010). Tolerance of nonindigenous cichlid fishes (*Cichlasoma urophthalmus*, *Hemichromis letourneuxi*) to low temperature: laboratory and field experiments in south Florida. *Biological Invasions* **12**, 2441-2457.
- Schultz, E. T., and McCormick, S. D. (2012). Euryhalinity in An Evolutionary Context. *EEB Articles Paper* **29**.
- Shafland, P.L., and Pestrak, J.M. (1982). Lower lethal temperatures for fourteen non-native fishes in Florida. *Environmental Biology of Fishes* **7**, 139-156.
- Sharma, S., Jackson, D. A., Minns, C. K., and Shuter, B. J. (2007). Will northern fish populations be in hotwater because of climate change? *Global Change Biology* **13**, 2052-2064.
- Shea, K., and Chesson, P. (2002). Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 170-176.
- Shuter, B. J., and Lester, N. P. (2004). Climate change and sustainable lake trout exploitation: predictions from a regional life history model. In 'Boreal shield watersheds: Lake trout ecosystems in a changing environment'. (Eds J. M. Gunn, R. J. Steedman, and R. A. Ryder.) pp. 281–291. (Lewis Publishers: Boca Raton, Florida.)
- Silva, J. W. B. (2010). Biologia e cultivo do Apaiari (*Astronotus ocellatus*) Swainson, 1839. In 'Espécies nativas para piscicultura no Brasil'. (Eds B. Baldisserotto, and L. C Gomes.) pp. 429- 458. (Editora UFSM: Brasil)
- Sioli, H. (1984). The Amazon and its main afluentes: Hydrogeography, morphology of the river courses and river types. In 'The Amazon. Limnology and Landscape Ecology

of a Mighty Tropical River and Its Basin' (Ed H. Sioli.) pp. 127–165. (Dr. W. Junk Publishers: Dordrecht.)

South Florida Natural Resources Center (SFNRC) DataForEVER Dataset, Everglades National Park, Homestead, FL, Generated by Gordon Anderson (USGS), using Appaserver software (<http://www.appaserver.com>), Sacramento, CA. Public URL not currently available, please send data requests to EVER_data_request@nps.gov. Retrieved 2 October 2014.

Stauffer, J. R., Jr. (1986). Effects of salinity on preferred and lethal temperatures of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Water Resources Bulletin* **22**, 205-208.

Ubeda, A. J., Simpfendorfer, C. A., and Heupel, M. R. (2009). Movements of bonnetheads, *Sphyrna tiburo*, as a response to salinity change in a Florida estuary. *Environmental Biology Fishes* **84**, 293–303.

Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F., and Randall, D. J. (2006). 'The Physiology of Tropical Fishes'. (Elsevier: Amsterdam)

Vitule, J. R. S., Freire, C. A. and Simberloff, D. (2009) Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries* **10**, 98–108.

Walker, N. D. (2001). Tropical storm and hurricane wind effects on water level, salinity, and sediment transport in the river-influenced Atchafalaya-Vermillion bay system, Louisiana, USA. *Estuaries* **24**, 498–508.

Webb, A. C. (2008). Risk Assessment Model Development for Establishment Success and Impact of Non-native Freshwater Fishes in the Wet Tropics Bioregion, Northern Queensland, Australia. Report 08/23. Australian Centre for Tropical Freshwater Research, James Cook University, Townsville

CONCLUSÕES GERAIS

A variação crítica de temperatura se mostrou um parâmetro bastante importante na determinação da tolerância térmica dos peixes. Através da metodologia de CTM foi possível observar que os peixes da região tropical da Bacia Amazônica como *C. macropomum* e *A. ocellatus*, apresentam uma resistência à elevação de temperatura que supera os 40°C, diferentemente do encontrado nas espécies de região temperada como *S. greeleyi*, *S. testudineus*, *R. quelen* e *H. ancistroides*, para os quais a CTM_{máx} não foi maior que 37°C. Essa maior tolerância de peixes tropicais pode ser explicada por suas histórias térmicas, visto que esses peixes já vivem em ambientes em que a temperatura da água é mais quente do que as águas de rios e estuários de regiões temperadas.

Quando comparadas espécies de proximidade filogenética como *S. greeleyi* e *S. testudineus*, foi possível observar que essas espécies, apesar dessa proximidade, apresentam diferenças nas tolerâncias a elevação crítica de temperatura, diferença essa que pode ser explicada pela ocupação de diferentes ambientes dentro da região estuarina onde são naturalmente encontrados. *S. greeleyi* que geralmente habita a parte mais salobra dos estuários, preferindo as águas rasas de rebentação da praia, apresentou uma menor tolerância à variação térmica. *S. testudineus* que habita tanto as águas rasas do estuário, mas que também alcança corpos de água que adentram as desembocaduras dos rios que desaguam no mar, atingindo áreas onde a salinidade é mais próxima à água doce, apresentou uma tolerância maior à temperatura crítica comparada ao seu congênere. Essa maior tolerância de *S. testudineus* pode estar ligada à sua maior plasticidade fisiológica, pois a espécie parece estar mais adaptada a suportar maiores variações de outros fatores ambientais como salinidade e pH, encontrados nas desembocaduras de rios nos quais ele adentra.

Quanto as espécies dulcícolas *R. quelen* e *H. ancistroides*, apesar de pertencerem a mesma ordem dos Siluriformes, elas são filogeneticamente distantes, mas apresentaram um padrão de tolerância similar à elevação crítica de temperatura. Essa semelhança pode estar ligada à ocupação de ambientes similares, ambos dulcícolas de rios e riachos, e possivelmente apresentam histórias térmicas e evolutivas semelhantes, visto que os Siuriformes são teleósteos originalmente de água doce, e já estão adaptados a esse tipo de ambiente há um longo tempo, o que justificaria uma adaptação às variações sofridas naturalmente na temperatura da água. Esse mesmo padrão de

tolerância similar para espécies de ambientes naturais similares foi observado nos peixes tropicais *A. ocellatus* e *C. macropomum*, que também não são filogeneticamente próximos, sendo o Oscar da ordem Perciformes, secundariamente de água doce, e o Tambaqui da ordem Characiformes, que tem sua origem na água doce. Apesar dessa diferente história evolutiva, ambas as espécies experimentam um regime térmico similar em seus ambientes nativos, e já habitam esses ambiente por tempo suficiente longo para que se adaptassem de forma similar a esse ambiente de águas quentes, e possuíssem respostas similares à variação térmica.

Em relação a expressão da proteína de estresse HSP70 foi possível observar que todas as espécies apresentaram níveis de expressão de proteína relativamente altos, mesmo que em condições controles, e esses valores em geral não se modificaram de forma expressiva mesmo quando houve aumentos na temperatura da água. Esse fator pode ser explicado devido à presença constitutiva de HSP70 nas células, manter a expressão constitutiva da proteína relativamente alta pode ser suficiente para responder a alterações de temperaturas abruptas e rápidas, como é o caso da elevação crítica de temperatura. Valores mais altos como os encontrados em *R. quelen* podem ser explicados pela fisiologia do peixe, essa espécie é uma espécie amplamente usada na piscicultura exatamente por apresentar uma tolerância alta a diversos estressores ambientais, o que também se aplica a temperatura, e isso pode explicar seus altos níveis de HSP70, possivelmente adaptado para lidar corriqueiramente com essas variações ambientais, lhe garantindo essa alta plasticidade fisiológica.

Assim como houve diferenças de expressão entre as espécies, também houve diferença de expressão de HSP70 nos tecidos. Brânquias, músculo e fígado respondem diferentemente ao choque térmico isso devido a natureza da função de cada tecido. Foi possível concluir que a expressão de HSP70 é espécie-específica e poderia ser mais bem avaliada se separadas a forma constitutiva da ativada, ficando como sugestão para trabalhos futuros a diferenciação dessa expressão para melhor compreensão da resposta ao choque térmico nas espécies estudadas.

A utilização de enzimas características de outras respostas fisiológicas como da osmorregulação e da regulação ácido base, ajuda na compreensão da resposta sistêmica ao choque térmico. Apesar de não ter sido observada uma mudança clara na atividade da Na^+/K^+ -ATPase, a H^+ -ATPase sofreu um aumento da atividade com o aumento da temperatura, que pode estar ligado aos efeitos indiretos da temperatura nas funções

fisiológicas relacionados a influência da elevação de temperatura na cinética enzimática e/ou nas estruturas ligadas ao funcionamento da enzima (como a membrana celular).

Ao analisar a resistência à salinidade isoladamente, *A. ocellatus* se mostrou tolerante à águas salobras que alcançavam 20ppt, o mesmo ocorrendo quando sua resistência à salinidade foi testada em uma temperatura mais alta, que se assemelharia as águas da região amazônica de onde é nativo. Porém ao se testar a tolerância da espécie em água mais frias, sua resistência a elevação salina diminuiu drasticamente, sendo praticamente nula sua sobrevivência em águas salobras por um período maior que poucos dias. Esse resultado demonstrou não somente que a espécie é mais vulnerável em águas frias, o que pode explicar sua não dispersão em altitudes maiores, mas também reforçou a alta tolerância da espécie em águas quentes e salobras, o que pode explicar sua ampla dispersão, seu apreço na aquariofilia, e seu alto potencial invasor.

A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que afeta a distribuição das espécies aquáticas. Os padrões de tolerâncias térmicas encontrados para os teleósteos estudados, assim como seus mecanismos fisiológicos para responder às variações térmicas, ajudam a compreender a ocupação dos ambientes em que essas espécies são encontradas, agregar dados à suas histórias térmicas, e fazer inferências sobre suas adaptações e possíveis dispersões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58:237–275.
- Beitinger, T., Lutterschmidt, W. (2011). *Measures of Thermal Tolerance*. Elsevier Inc. 8 pp.
- Bensaude, O., Pinto, M., Dubois, M. F., Van Trung, N. and Morange, M. (1990). Protein denaturation during heat shock and related stress. In: M.J. Schlesinger, M.G. Santoro and E. Garaci (Eds) *Stress Proteins: Induction and Function*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 89–99.
- Boussau B, Blanquart S, Necsulea A, Lartillot N, Gouy M. 2008. Parallel adaptations to high temperatures in the Archaean eon. *Nature* 456:942–945.
- Brett, J. R. (1956). Some principles in the thermal requirements of fishes. *The Quarterly Review of Biology*, 31:75–88
- Carveth, C. J., Widmer, A. M., Bonar, S.A. (2006). Comparison of upper thermal tolerances for native and nonnative fish species in Arizona. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135:1433–1440.
- Cooke, S.J., Sack, L., Franklin, C.E., Farrell, A.P., Beardall, J., Wikelski, M., Chown, S.L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology* 1.
- Cox, D.K. (1974). Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In: Gibbons, J.W. and Sharitz, R.R. (eds.) *Thermal Ecology*, pp. 158–163. Alexandria, VA: National Technical Information Services.
- Currie, S. (2011). Heat Shock Proteins and Temperature. In: Farrel, A. P. (ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego: Academic Press. Pp. 1688-1694.
- Dahlhoff, E. P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology*, 66: 183-207.
- Das, T., Pal, A.K., Chakraborty, S.K., Manush, S.M., Sahu, N.P., Mukherjee, S.C. (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry

- (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. *Journal Thermal Biology* 30:378-383
- Eddy, F.B., Handy, R.D. (2012). *Ecological and environmental physiology of fishes. Ecological and Environmental Physiology Series, 4.* Oxford University Press: Oxford. 253 pp.
- Evans, D. H., Claiborne, J. B. (2009). Osmotic and ionic regulation in fishes. In: D.H. Evans (ed.) *Osmotic and ionic regulation: cells and animals.* CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 295–366.
- Evgen'ev, M. B., Garbuz, D. G., Zatssepina, O. G. (2014). *Heat Shock Proteins and Whole Body Adaptation to Extreme Environments.* Dordrecht Springer Netherlands. 218 p.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61:243-282.
- Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J. (2007). Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17:581-613.
- Fields, P.A. (2011). Proteins and temperature. In: Farrell, A.P. (ed). *Encyclopedia of fish physiology: Energetics, interactions with the environment, lifestyles, and applications.* Academic, New York. 1703-1708.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79:425-449.
- Franklin, C.E., Seebacher, F. (2012) Conservation physiology: integrating physiological mechanisms with ecology and evolution to predict responses of organisms to environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 367:1605–1779.
- Freire, C. A, Prodocimo, V. (2007). Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. In: Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.) *Fish Osmoregulation.* Vol. 1. Science Publishers, Enfield, pp. 249–276.

- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. pp. 1-98. In: Fish Physiology, Vol. VI. W. S. Hoar and D. J. Randall, eds., Academic Press, NY.
- Gaston, K.J., Chown, S.L., Calosi, P., Bernardo, J., Bilton, D.T., Clarke, A., Clusella-Trullas, S., Ghalambor, C.K., Konarzewski, M., Peck, L.S., Porter, W.P., Pörtner, H.O., Rezende, E.L., Schulte, P.M., Spicer, J.I., Stillman, J.H., Terblanche, J.S., van Kleunen, M. (2009). Macrophysiology: a conceptual reunification. *American Naturalist* 174: 595–612.
- Healy, T.M., Tymchuk, W.E., Osborne, E.J., Schulte, P.M. (2010). Heat shock response of killifish (*Fundulus heteroclitus*): candidate gene and heterologous microarray approaches. *Physiological Genomics*. 41:171–184.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. (2002). Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford , New York : Oxford University Press.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A. (1997). Extreme Environmental Change and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge
- Hofmann, G. E. (2005). Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, 45:247-255.
- Hofmann, G. E., Todgham, A. E. (2010). Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual Review of Physiology*, 72:127-145.
- Hutchison, V. E (1976). Factors influencing thermal tolerance of individual organisms. In: Esch, G. W and McFarlane R. W. (eds) Thermal Ecology II. U.S. National Technical Information Service, Springfield. pp. 10-26.
- Iwama, J. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207:15-19.
- Johnston, A. A. and Bennett, A. F. (1996). Animals and Temperature: Phenotypic and Evolutionary Adaptation. Society for Experimental Biology Seminar Series 59. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

- Kayhan, F. E., Duman, B. S. (2010). Heat shock protein genes in fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(2):287–293.
- Metz, J. R., Van Den Burg, E. H., Bonga, S. E. and Flik, G. (2003). Regulation of branchial Na^+/K^+ -ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 206:2273-2280.
- Morimoto, R.I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes and Development* 12: 3788–3796.
- Moyes, C.D., Ballantyne, J.S. (2011). Membranes and Temperature: Homeoviscous adaptation. In: Farrell, A.P. (ed) *Encyclopedia of fish physiology: Energetics, interactions with the environment, lifestyles, and applications*. Academic, New York. 1725-1731.
- Place, S. P., Hofmann, G .E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in a phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biology*, 28:261-267.
- Portner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 132:739-761.
- Rezende, E. L., Castañeda, L. E., Santos, M. (2014). Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology*, 28:799–809.
- Robertson, J. C. and Hazel, J. R. (1999). Influence of temperature and membrane lipid composition on the osmotic water permeability of teleost gills. *Physiological and Biochemical Zoology* 72, 623-632.
- Schulte, P.M., Healy, T.M., Fangue, N.A. (2011). Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integrative and Comparative Biology* 51: 691–702
- Schulte, P.M. (2011). Effects of Temperature: An Introduction. In: Farrell, A. P. (ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press, San Diego, CA. Pp. 1688-1694.
- Somero, G.N. (1995). Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*. 57:43-68.

- Somero GN (2005) Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in Zoology* 2:1–9.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology*, 213:912–920.
- Sorensen, J. G., Kristensen, T. N., Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6:1025-1037.
- Spicer, J.I., Gaston, K.J. (1999) *Physiological Diversity and its Ecological Implications*. Blackwell Science, Oxford.
- Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81:709–717.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005). *Environmental physiology of animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.